

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotnická technika a informatika



Bc. Anna Módos

Metabolismus estrogenů u UGT1A1 deficientních potkanů

Metabolism of estrogene in UGT1A1-deficient rats

Typ závěrečné práce

Diplomová

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Lucie Muchová, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím/Nesouhlasím* s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11.08.2011

Podpis

Identifikační záznam:

MÓDOS, Anna. *Metabolismus estrogenů u UGT1A1 deficientních potkanů.*

[Metabolism of estrogens in UGT1A1-deficient rats]. Praha, 2011. 100 s. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze 1. lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Muchová, Lucie.

Abstrakt

1. Úvod

Estrogeny indukovaná cholestáza je onemocnění charakterizované poruchou tvorby a toku žluči u žen užívajících antikoncepci, hormonální substituční terapii nebo u těhotných. Metabolismus estrogenů je komplexní proces s tvorbou metabolitů různé biologické aktivity. Probíhá primárně v játrech (fáze I, hydroxylace a fáze II, methylace, sulfatace a glukuronidace). Za glukuronidaci estrogenů jsou zodpovědné enzymy z rodiny UDP-glukuronosyltransferáz, označované zkratkou UGT.

1. Cíl práce

Cílem práce je definovat metabolismus estrogenů a exprese genů UGT1A1, CYP1A2 a SULT1A1 u potkanů kmene Gunn a definovat cholestatické jaterní poškození u potkanů s vrozeným defektem enzymu UGT1A1 (kmen Gunn) ve srovnání s potkany s normální aktivitou enzymu a pokusit se odvodit mechanismy, kterými k jaternímu poškození dochází.

2. Metodika

Potkanům kmene Gunn a odpovídajícím heterozygotům s normální aktivitou UGT1A1 byla indukována cholestáza subkutánní aplikací ethinylestradiolu (5mg/kg) po dobu 5-ti dní. Šestý den byla zvířata usmrcena a byla jim odebrána plasma a jaterní tkáň k dalším analýzám. Markery cholestázy a jaterního poškození: ALP, AST, ALT a bilirubin byly stanoveny na automatickém analyzátoru, celkové žlučové kyseliny spektrofotometricky. Z jater jsem izolovala mRNA, přepsala do cDNA a provedla jsem kvantitativní real-time PCR klíčových enzymů estrogenového metabolismu pomocí TaqMan analýzy. Hodnotila jsem exprese genů UGT1A1, CYP1A2 a SULT1A1.

3. Výsledky

U potkanů kmene Gunn došlo po aplikaci ethinylestradiolu (EE) k signifikantnímu nárůstu cholestatických markerů ve srovnání s heterozygoty (sérové žlučové kyseliny 10x, ALP 5,4x, $p \leq 0,05$). Exprese UGT1A1 byla u heterozygotů ve srovnání s kontrolami po podání EE signifikantně zvýšená (3x, $p = 0,02$). Aplikace EE rovněž vedla u potkanů kmene Gunn k většímu poklesu exprese CYP1A1 (o 54%) a SULT1A1 (o 84%) oproti odpovídajícím heterozygotům (o 27% a 70%, $p \leq 0,05$).

4. Závěr

Zjistili jsme, že UGT1A1 deficientní potkani vyvinuli významně těžší cholestázu ve srovnání s odpovídajícími heterozygoty. Defekt UGT1A1 vede k odlišnému

metabolismu estrogenů, poruše hydroxylace, glukuronidace i sulfatace, což může mít za následek hromadění toxických estrogenových metabolitů a vznik cholestázy.

Klíčová slova: Gilbertův syndrom, UGT1A1, Gunn, glukuronidace, UDP-glukuronosyltransferáza, ethinylestradiol, cholestáza, CYP1A2, SULT1A1, metabolismus estrogenů, intrahepatální cholestáza těhotných

Abstract

Introduction

Estrogen-induced cholestasis is a disease characterized by a failure of bile flow and bile production. It can develop in women after oral contraceptives use, hormone replacement therapy or during pregnancy. The estrogen metabolism is a complex process leading to formation of metabolites with different biological activities. It takes place primarily in the liver (Phase I and Phase II including hydroxylation, methylation, sulfation and glucuronidation). The enzymes from UDP-glucuronosyltransferases family, abbreviated UGT, are responsible for the glucuronidation of estrogens.

Aims

The objective of my work is to define estrogen metabolism and gene expression of UGT1A1, CYP1A2 and SULT1A1 and characterize cholestatic liver damage in the UGT1A1 deficient rat strain (Gunn rats) compared to rats with normal enzyme activity and try to define possible mechanisms responsible for the liver damage.

Methods

Adult female Gunn and corresponding heterozygous rats were treated with ethinylestradiol (EE, 5 mg/kg body weight SC) for 5 days, while control rats received propanediol (vehicle). Day six, the animals were sacrificed and plasma and liver tissue were collected for analysis. Markers of cholestasis and liver damage ALP, AST, ALT and bilirubin were determined using an automatic analyzer, total bile acids were measured spectrophotometrically. I isolated mRNA from the liver, transcribed it into cDNA and I performed a quantitative real-time PCR of key enzymes of estrogen metabolism by TaqMan analysis. I evaluated gene expressions of UGT1A1, CYP1A2, and SULT1A1.

Results

EE administration significantly increased cholestatic markers in Gunn rat strain (serum bile acids 10-fold, ALP 5.4-fold, $p \leq 0.05$) in comparison with heterozygotes. Expression of UGT1A1 was significantly increased in heterozygous rats (3-fold, $p = 0.02$) after application of EE as compared to controls. Application of EE also led to more pronounced decrease in CYP1A1 (54%) and SULT1A1 (84%) expressions in Gunn rats as compared to the corresponding heterozygous rat strain (27% and 70%, respectively, $p \leq 0.05$).

Conclusion

We found that UGT1A1 deficient rats developed significantly more severe cholestasis

as compared to the corresponding heterozygotes. UGT1A1 defect leads to a different metabolism of estrogen, impaired hydroxylation, glucuronidation and sulfation, which may cause accumulation of toxic metabolites of estrogens and development of cholestasis.

Keywords: Gilbert syndrome, UGT1A1, Gunn, glucuronidation, UDP-glucuronosyltransferase, ethinylestradiol, cholestasis, CYP1A2, SULT1A1, estrogen metabolism, intrahepatic cholestasis of pregnancy

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mojí vedoucí práce, paní MUDr. Lucii Muchové, PhD. za čas a trpělivost, kterou věnovala při přípravě této diplomové práce. Též bych ráda poděkovala za pomoc při práci v laboratořích ÚKBLD a to konkrétně Ing. Kateřině Váňové a MUDr. Václavu Šmídovi.

Obsah

1 ÚVOD	11
1.1. Estrogeny	11
1.1.1. Struktura estrogenů	11
1.1.2. Produkce estrogenů	12
1.1.3. Estrogenové receptory	13
1.2. Metabolismus estrogenů	16
1.2.1. Cytochrom P450	18
1.2.2. Hydroxysteroidní oxidoreduktázy/dehydrogenázy	24
1.2.3. Sulfotransferázy (SULT)	24
1.3. Fyziologické funkce estrogenů	28
1.3.1. Klinický význam estrogenů	28
1.4. Estrogeny a nádorové bujení	29
1.4.1. Estrogenové receptory a karcinom prsu	32
1.5. Estrogeny a cholestáza	32
1.5.1. Anatomie žlučového systému a vylučování žluči	34
1.5.2. Biochemické testy při cholestáze	37
1.5.3. Intrahepatální cholestáza těhotných	43
1.6. Progesteron	45
1.6.1. Syntetické estrogeny	46
1.6.2. Fytoestrogeny	46
1.7. Role UGT1A1 v metabolismu estrogenů	47
1.8. Potkani kmene Gunn jako model pro studium metabolismu estrogenů	50
2 METODIKA	52
2.1. Zvířecí experiment	52
2.2. Biochemické metody	53
2.2.1. Stanovení aktivity aminotransferáz ALT a AST	55
2.2.1.1. ALT	55
2.2.1.2. AST	56
2.2.2. Stanovení alkalické fosfatázy ALP	57
2.2.3. Stanovení celkového bilirubin	58
2.2.4. Stanovení CRP	59
2.2.5. Stanovení celkové bílkoviny	60
2.3. Stanovení celkových žlučových kyselin	61

2.4. Molekulárně biologické metody	63
2.4.1. Izolace RNA	63
2.4.2. Měření koncentrace a čistoty RNA	65
2.4.3. Analýza RNA gelovou elektroforézou	65
2.4.4. Reverzní transkripce	67
2.4.5. Real – time PCR (qPCR)	68
3 VÝSLEDKY	72
3.1. Biochemické parametry séra	72
3.2. Koncentrace RNA	76
3.2.1. Elektroforéza	77
3.3. qPCR	78
4 DISKUZE	87
5 ZÁVĚR	90
6 LITERATURA	91
7 SEZNAM ZKRATEK	98

1. ÚVOD

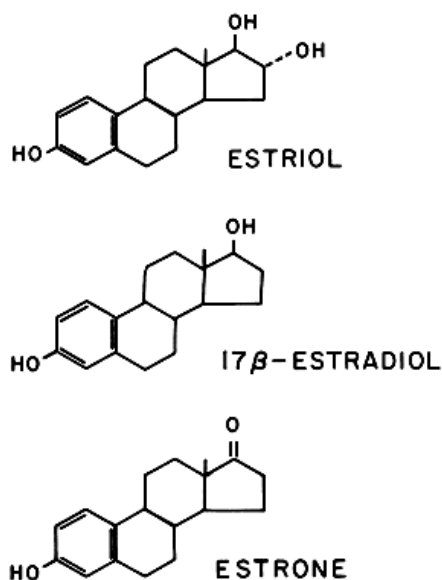
1.1. Estrogeny

1.1.1. Struktura estrogenů

Estrogeny jsou skupinou C_{18} steroidů syntetizovaných v procesu steroidogeneze z cholesterolu. Jejich název je odvozen z estrálního cyklu, v němž hrají důležitou roli. Všechny přirozeně se vyskytující estrogeny mají aromatický kruh A, hydroxylovou skupinu v poloze C3 a methylovou skupinu v poloze C13. (viz obr. 2). [1]

Primárně představují ženské pohlavní hormony, ale v malé míře se vyskytují i v těle mužů. Estrogeny secernují hlavně granulózní buňky ovariálních folikulů, corpus luteum a placenta. V nízkých dávkách mohou být rovněž produkovány některými dalšími tkáněmi, jako jsou játra, nadledvinky, prsní žláza nebo tuková tkáň. Estrogeny jsou mimoto součástí některých antikoncepčních léků a hormonální substituční terapie pro ženy po menopauze. Také se podávají transsexuálům, kteří se chtějí stát ženou. Jako všechny steroidy, i estrogeny bez problémů pronikají buněčnou membránou a vážou se na estrogenové receptory uvnitř buněk. [2]

Přirozeně se vyskytující estrogeny jsou 17β -estradiol, estron a estriol.



Obr. 1 Struktura estrogenů (převzato z www.glowm.com/?p=glowm.cml/section_view&articleid=101)

Hlavním a zároveň nejúčinnějším estrogenem menstruačního cyklu je estradiol, který je v krvi v metabolické rovnováze s estronem. Naopak estriol je nejslabším estrogenem ze všech tří hormonů. Dvě procenta cirkulujícího estradiolu jsou volná a zbytek je vázán na bílkovinu – 60 % na albumin a 38% na steroidní vazebný globulin GBG. [3] [4]

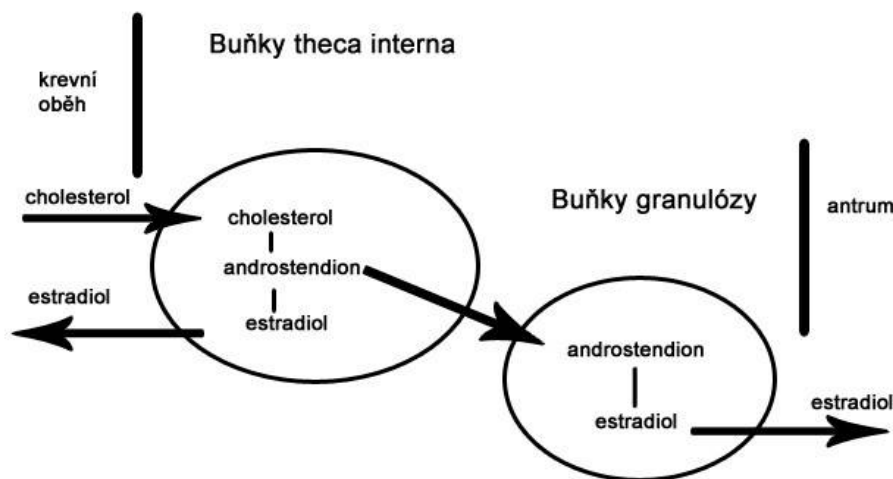
1.1.2. Produkce estrogenů

Téměř všechny estradiol pochází z vaječníků a má dva vrcholy sekrece. První vrchol je těsně před ovulací, druhý uprostřed luteální fáze. Sekreční rychlost estradiolu je 36µg/d v časně folikulární fázi, 380 µg/d těsně před ovulací a 250 µg/d uprostřed luteální fáze. Po nástupu menopauzy klesá sekrece estrogenů k nízkým hodnotám.

Vaječníky (*ovaria*) jsou samičí párová pohlavní žláza uložena po stranách dělohy, jsou tvořeny kůrou a dření. Funkcí tohoto orgánu je produkce pohlavních buněk (oogeneze) a tvorba pohlavních hormonů. Folikuly, obsažené v kůře vaječníků, obalují vajíčka a po určitou dobu zrají v Graafův folikul, který se skládá z několika vrstev – theca folikuli externa, theca folikuli interna a membrana granulosa. Právě folikuly jsou místa, kde probíhá steroidogeneze. Jsou velmi dobře prokrveny a jejich vnitřní vrstvy produkují velké množství progesteronu a androgenů sloužících jako prekurzory pro syntézu estrogenů pomocí enzymu aromatázy a 17β-HSD (17β- hydroxysteroid dehydrogenáza) typu 1 a 7, které napomáhají následné přeměně estronu na 17β-estradiol. [5]

Buňky theca folikuli interna mají mnoho receptorů pro luteinizační hormon (LH). LH působí cestou cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a zvyšuje přeměnu cholesterolu na androstendion. Část androstendionu je přeměňována na estradiol, který vstupuje do cirkulace. Buňky theca interna též zásobují androstendionem buňky granulózy, která při přísunu androgenů tvoří estradiol. Takto vytvořený estradiol se secernuje do folikulární tekutiny. FSH (folikulární stimulující hormon) podporuje v buňkách granulózy sekreci estradiolu cestou cAMP. LH též podporuje tvorbu estradiolu v granulózových buňkách. Stromální tkáň vaječníků mají též schopnost

tvůřit androgeny a estrogeny, ovšem u žen před menopauzou je jejich produkce málo významná.



Obr.2 Interakce mezi thekálními a granulózovými buňkami při syntéze a sekreci estradiolu (převzato z ALBERTS, Bruce, et al. *Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie buňky*, 1998)

1.1.3. Estrogenové receptory

Biologické účinky estrogenů jsou zprostředkovány především estrogenovými receptory, které kromě nukleárních estrogenových receptorů (ER) zahrnují i G-protein vázané ER a sirotčí nukleární receptory (ERR).

Jako všechny steroidy, i estrogeny bez problémů pronikají buněčnou membránou a vážou se na ER uvnitř buněk. [2] ER jsou za normálních okolností lokalizovány v cytoplazmě ve vazbě na HSP90 (heat shock protein 90). Po navázání estrogenu vzniká komplex ER-ligand, který dimerizuje s dalším komplexem a translokuje se do jádra. V jádře se takovýto homodimer váže na specifickou oblast DNA, takzvanou estrogen responsivní jednotku (ERE), která následně ovlivňuje transkripci nejrůznějších genů. Tento způsob přepisu se nazývá klasický.

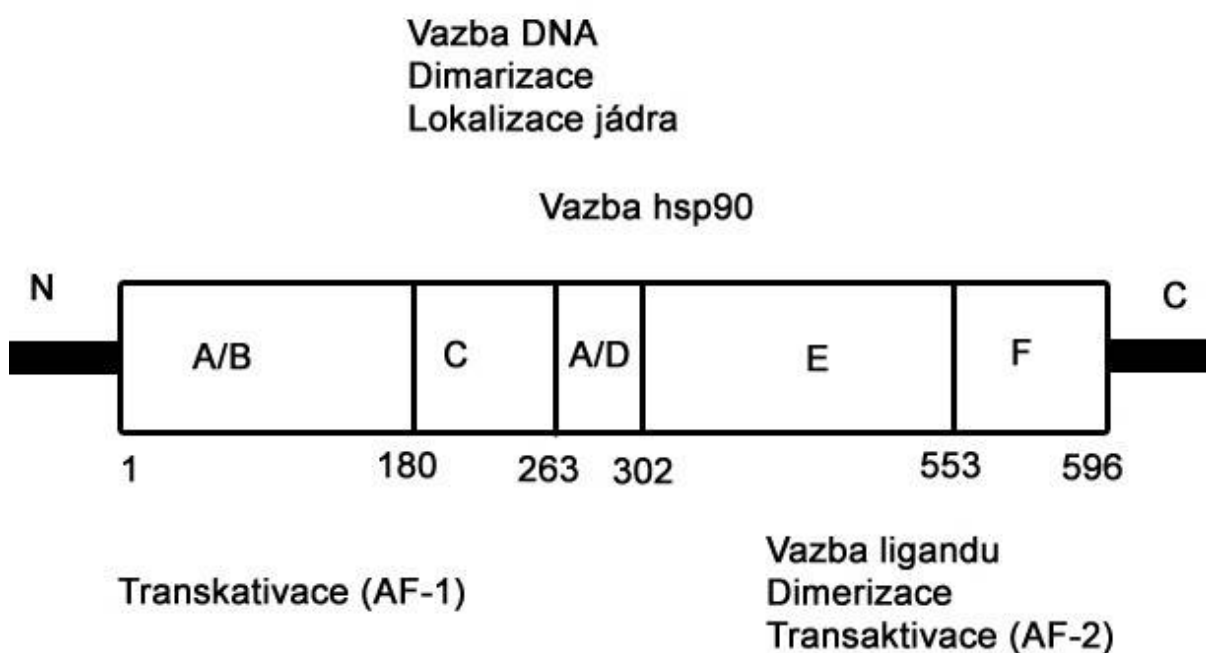
V současné době známe dva druhy ER: ER α a ER β [6]

ER β byl klonován v roce 1996 a lidský ER β byl popsán v roce 1997. Stejně tak jako dříve známý ER α , je i ER β členem velké rodiny (superfamily) všech steroidních

receptorů, vitaminu D a dalších retinoidů. Od receptoru alfa se liší ve struktuře hormon-vázající domény a N-terminální domény. Tato doména obsahuje oblast AF-1 (aktivační funkce 1), což je místo vazby různých proteinů účastnících se transkripce. Tato oblast není hormonálně specifická. Z toho vyplývají rozdíly mezi oběma receptory ve vztahu k vazbě ligandu (proteinu spouštějícího transkripční kaskádu). [7]

Naopak receptor ER α je detailně prostudován a slouží jako prediktivní marker pro hormonální léčbu. Patří do skupiny nukleárních receptorů aktivovaných ligandy. Komplex estradiolu a ER může regulovat expresi genů i bez přímé interakce s DNA cestou jiných transkripčních faktorů jako je komplex aktivovaného proteinu Fos/Jun a AP-1 (Activator protein 1). Tento způsob přepisu je označován za neklasický [8].

ER se skládá z několika funkčních domén:



Obr. 3 Estrogenový receptor (převzato z ALBERTS, Bruce, et al. *Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie buňky*, 1998)

Doména A/B má vnitřní schopnost aktivovat transkripci. Tato funkce je označovaná jako AF-1. Je to aktivita, které je nezávislá na vazbě estrogenů nebo antiestrogenů [9]. Pro plnou aktivaci AF-1 in vitro je nutná fosforylace serinu (Ser) na

pozici 118 v ER, která je možná i cestou Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskády signální dráhy pro růstový faktor. Aktivací této cesty může tedy dojít k zvýšení exprese genů regulovaných ER, které jsou závislé na AF-1 i v nepřítomnosti estrogenů nebo antiestrogenů. [10]

Doména C je důležitá při translokaci do jádra, dimerizaci receptorů a vazbu chaperonových proteinů.

Doména D slouží k oddělení domény C a E.

Doména E je důležitá pro vazbu přirozeného ligandu ER estradiolu (HBD - hormone binding domaine). Kromě toho je hlavní oblastí dimerizace receptorů a aktivace transkripce závislé na ligandech. Tato funkce je označována jako AF-2 (aktivační funkce 2). AF-1 a AF-2 působí ve většině buněk synergicky. U některých genů však mohou být aktivovány nezávisle na sobě. Jejich funkce však může být dál modulována přítomností koregulačních proteinů. Byly popsány jak koaktivátory, které zesilují transkripci, tak korepresory, které ji tlumí.

Koaktivátory jsou skupina proteinů, které stimulují aktivitu ER cestou funkce AF-2. K nejdůležitějším patří koaktivátor nukleárního receptoru 1 (NCoA1 - nuclear receptor coactivator 1, známý i jako SRC1- steroid receptor coactivator), NCoA2 (nuclear receptor coactivator 2) a NCoA3 (nuclear receptor coactivator 3) AIB1 (Amplified in Breast Cancer-1) [11]. Byly popsány i dva korepresory: NCoR1 (nuclear receptor co-repressor 1) a NCoR2 (nuclear receptor co-repressor 2) (rovněž pod názvem SMRT-silencing mediator of retinoic acid). Je nutné zmínit, že i cyclin D1, protein, který reguluje buněčný cyklus, se může chovat jako koaktivátor a může aktivovat transkripci zprostředkovanou cestou ER.

Agonistický a antagonistický profil účinku látek typu SERM (selective ER modulators), mezi které patří i tamoxifen (užívaný při prevenci a léčbě karcinomu prsu), je částečně způsoben aktuální hladinou koaktivátorů a korepresorů v jednotlivých buňkách. Navíc se na něm může podílet i přítomnost nebo nepřítomnost úseků závislých na estrogenech (ERE) v promotorech jednotlivých genů.

1.2. Metabolismus estrogenů

Steroidogeneze

Všechny steroidogenní tkáně mají stejné enzymatické dráhy vedoucí k biosyntéze estrogenů. Hlavní fyziologické změny na úrovni enzymů jsou obvykle spojeny s paralelními změnami v genové expresi. Úroveň exprese každého steroidogenního enzymu se liší ve třech charakteristikách:

1. tkáňovou a buněčně specifickou expresí, která je určena během tkáňové a buněčné diferenciaci
2. bazální expresí při absenci trofické hormonální stimulace
3. hormonálním signálem regulovaným expresí

Každý z těchto tří typů exprese pravděpodobně představuje fungování různých genových regulačních elementů. U dospělých steroidogenních tkáních je hladina většiny buněčně a tkáňově specifických enzymů závislá hlavně na trofické hormonální stimulaci, která je zprostředkována komplexní sítí systémů signální transdukce. [12]

Steroidy jsou syntetizovány z cholesterolu, který je odvozen ze tří potencionálních zdrojů:

- preformovaný cholesterol z krve, především ve formě cirkulujících lipoproteinů
- preformovaný cholesterol uložený ve steroidogenních buňkách jako volný cholesterol, složka buněčných membrán nebo uvolněný z cholesterolových esterů uložených v cytoplazmatických lipidových kapičkách
- cholesterol syntetizovaný de novo ve steroidogenních buňkách z dvouuhlíkatých sloučenin odvozených od metabolismu karbohydrátů, tuků nebo proteinů v rámci buňky. V závislosti na cévním zásobení a na převládajících fyziologických podmínkách mohou být zdroje cholesterolu variabilní v rámci tkání a druhů.

Vstřebávání cholesterolu z krve zahrnuje vazbu extracelulárního lipoproteinu přes jejich apoproteinovou komponentu na specifický receptor lokalizovaný na buněčných membránách, následuje internalizace komplexu lipoproteinu s receptorem do lysozomu, degradace lipoproteinu lysozomálními 17 esterázami a uvolnění volného

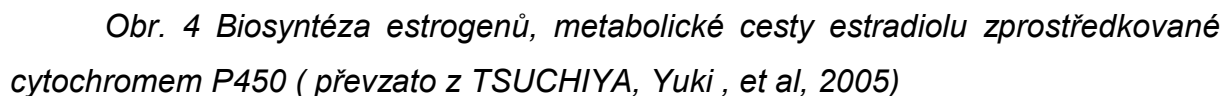
cholesterolu, který je přístupný steroidogenním enzymům. Vstřebávání LDL a HDL je regulováno na úrovni jejich receptorů.

Steroidogenní buňky skladují také značné množství cholesterolu v intracelulárních tukových kapičkách, hlavně jako estery mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Rovnováha mezi cholesterolem esterů mastných kyselin z intracelulárních zásobáren a volným cholesterolem je nastavena poměrem mezi dvěma enzymy: cholesterol-ester syntetázou a cholesterol esterázou (hydrolýza esterů cholesterolu na cholesterol, tento enzym může být aktivován luteinizačním hormonem). Aktivita obou enzymů jsou rychlost určujícím krokem, který je pod kontrolou hormonální a navíc by měly být regulovány intracelulární hladinou cholesterolu. Poměrné využití těchto zdrojů pro steroidogenezi se může značně lišit na základě fyziologického stavu. [13]

Biosyntéza estrogenů

Estrogeny syntetizovány v sérii chemických reakcí využívajících cholesterol jako prekurzor. Steroidogenní enzymy můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou hydroxylázy, kódované geny patřící do superrodiny cytochromů P450, do druhé skupiny řadíme hydroxysteroidní oxidoreduktázy, popř. dehydrogenázy.

Biosyntéza estrogenů vyžaduje tři na železu založené cytochrom P450 enzymové komplexy a dvě dehydrogenázy. [14] Rychlost regulujícím krokem je odštěpení postranního řetězce cholesterolu pomocí mitochondriálního enzymu cytochrom P450, čímž vzniká skupina C21 steroidů, pregnenolon. Následuje konverze C21 steroidů v C19 steroidy pomocí enzymu endoplazmatického retikula, 17 α -hydroxylázy a oxidace hydroxylové skupiny na C3 pozici na keto skupinu pomocí 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy. Výsledkem je syntéza C19 estrogenního prekurzoru, androstenedionu. Androstenedion je pomocí dalšího enzymu endoplazmatického retikula, cytochrom P450 aromatázy, konvertován v estrony- C18 steroidy. Aromatáza katalyzuje aromatizaci A-kruhu androstenedionu na fenolický A-kruh typický pro estrogeny. Androstenedion i estron jsou substráty pro 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázu, která reverzibilně konvertuje tyto oxosteroidy na testosteron a 17 β -estradiol. Toto je konečný krok v produkci androgenů a estrogenů. [13]



„Mikrosomální CO-vázající pigment“ neboli „buněčný chromofor“, jak byl kdysi nazýván cytochrom P450, byl objeven Klingenbergem v roce 1958. [15] Písmeno P v jeho názvu značí pigment a číslo 450 značí vlnovou délku absorpčního maxima při 450 nm redukované formy s navázaným oxidem uhelnatým. Protein byl pojmenován v roce 1961 jako cytochrom P450 (CYP). [16] Struktura byla objasněna o několik let později, stejně jako jeho funkce. CYP je hemoprotein typu b. Typ hemu, označený písmenem, je odvozen od jeho struktury, resp. ligandu, navázaném na protoporfyrinovém jádře - pátým ligandem je thiolátový anion pocházející z cysteinu. [17] Šestým ligandem hemu se v průběhu reakce stává molekula O₂. Enzymy této skupiny se liší svými apoproteiny, jejichž rozličnost je příčinou různé substrátové specifity jednotlivých enzymů. Dnes je známo, že fyziologickou funkcí CYP je metabolizovat endogenní substráty i xenobiotika. Jako endogenní substráty CYP byly

dosud identifikovány nasycené a nenasycené mastné kyseliny, ikosanoidy, steroly a steroidy, žlučové kyseliny, vitamin D3 a jeho deriváty, retinoidy a uroporpyrinogen. CYP může metabolizovat i exogenní látky jako léčiva, chemické sloučeniny a polutanty životního prostředí i produkty metabolismu rostlin. Přestože se CYP účastní detoxikace organismu od cizorodých látek, může se působení nebo zvýšená aktivita některých izoform CYP11 podílet na zvýšení rizika kancerogeneze, vrozených defektů a jiných patologických reakcích. [18]

Reakční cyklus CYP

Monooxygenace substrátů vyžaduje kyslík a redukční ekvivalent v podobě NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) nebo NADH (NADH ubichinon-reduktáza). Bakteriální CYP využívají až na výjimky jako redukční ekvivalent elektrony z NADH, u eukaryotních z NADPH. [19] Mikrosomální CYP se skládá ze dvou na membránu vázaných komponent, a sice CYP a NADPH-cytochrom P450 reduktázy, původně nazvané NADPH-cytochrom c reduktázy. Samotná cytochrom P450 reduktáza obsahuje jako kofaktory FMN (flavinmononukleotid) i FAD (flavinadenindinukleotid). FAD přijímá 2 elektrony z NADPH a přes FMN je dále přenáší. Elektrony jsou tedy přenášeny po cestě NADPH > FAD > FMN > CYP. [20] Transferu elektronu na mitochondriální CYP pomáhají 2 rozpustné sloučeniny, a sice flavoprotein spojený s NADPH a protein s atomy síry a železa v molekule. Tyto enzymy byly poprvé nalezeny v dřeni nadledvin, a proto jsou označovány jako adrenodoxinreduktáza a adrenodoxin . [21] Exprese adrenodoxinreduktázy je konstitutivní, exprese adrenodoxinu je indukovatelná hypofyzárními hormony, prostřednictvím cAMP. Oxygenace substrátu a následná regenerace CYP je cyklický proces a vyžaduje postupně přenos 2 elektronů z NADPH. Jeden elektron je dodán komplexu substrát-oxidovaný CYP pro redukci hemového železa a druhý elektron je zapotřebí pro aktivaci kyslíku vázaného na hem oxygenovaného CYP. Tím se rozdělí vazba O-O a jeden atom kyslíku je redukován na vodu a druhý je inkorporován do substrátu. Malá část oxygenovaného CYP uvolňuje molekulu O₂ ve formě superoxidového radikálu jako vedlejší, minoritní produkt reakce. [22]

CYP v metabolismu léčiv

Interindividuální variabilita v metabolismu léčiv a endogenních látek je obrovská. Hladina léčiva v plazmě může při stejné dávce nabývat řádově naprosto jiných hodnot u dvou jedinců stejné hmotnosti. Endogenní příčiny jsou jednak v genetické výbavě jedince, pohlaví, věku, ale také v jeho fyziologickém, resp. patofyziologickém stavu. Variabilita genetické informace kódující enzymy může mít obrovský dopad na jejich metabolickou aktivitu. Různá aktivita těchto enzymů se pak projeví různou schopností biotransformovat léčiva ale i v metabolismu endogenních látek. Mutace genu pro CYP může dát vzniknout enzymu s nižší, vyšší, kvalitativně pozměněnou nebo dokonce nulovou aktivitou. Mutace také vůbec nemusí mít vliv na aktivitu enzymu. [23]

Enzymy – cytochromy P450 účastníci se steroidogeneze:

CYP11A

CYP11A je zapotřebí při třech reakcích, které zahajují steroidogenezi a při kterých dochází k přeměně cholesterolu na pregnenolon: nejprve probíhá 20 α -hydroxylace, následně 22R-hydroxylace a nakonec se vazba C20, C22 rozštěpí. [24] Je vázán na vnitřní membránu mitochondrií ve všech steroidogenních tkáních a ve velmi malých množstvích ho exprimují i některé části mozku. [12]

CYP17

Díky CYP17 je umožněna tvorba androgenů v endoplazmatickém retikulu. Provádí 17 α -hydroxylaci a štěpení C17-20 v hojném množství v Leydigových buňkách varlat a folikulu ve vaječnících, ale ne v placentě. V kůře nadledvin katalyzuje CYP17 17 α -hydroxylaci pregnenolonu a progesteronu měnících se na 17 α -hydroxysteroidy nacházející se v zona fasciculata a reticularis, nicméně štěpení C17-20 je zde jen slabé. Z 17 α -hydroxysteroidů se díky dalším CYP17 můžou stát dehydroepiandrosteron (DHEA) nebo androstandion. [25]

CYP19

CYP19 neboli aromatáza na endoplazmatickém retikulu způsobuje konverzi androgenů (androstandionu a testosteronu) v estrogeny, hlavně 17 β -estradiol ve

vaječnicích, kůře nadledvin, tukové tkáni, mozku a placentě. Hraje snad nejdůležitější roli při diferenciaci, vývoji, reprodukci a sexuálním chování. Nejprve proběhne C-19 hydroxylace a následně aromatizace kruhu A na základě eliminace jednoho vodíku (uvolní se kyselina mravenčí). [12] [26]

CYP1A1/2

Podrodina CYP1 obsahuje pouze dva dobře charakterizované isoenzymy: CYP1A1 a CYP1A2. Oba katalyzují stejné reakce. I přes vysokou homologii aminokyselinové sekvence (až 70 %) se liší lokalizací ve tkáních, CYP1A1 je primárně exprimován v extrahepatických tkáních, především po indukci řadou specifických substrátů, zatímco CYP1A2 je typickým jaterním enzymem se širokou substrátovou specifikitou, který je v jaterní tkáni exprimován konstitutivně. [27] CYP1A1 a CYP1A2 se také podílejí na aktivaci genotoxických látek přítomných např. v cigaretovém kouři. Byl detekován nejen v plicním karcinomu kuřáků, ale i v nádorech prsu. [28] CYP1A1 a CYP1A2 jsou tedy mikrosomální inducibilní enzymy, které se podílejí na bioaktivaci PAHs (polycyklické aromatické uhlovodíky), jako například silný karcinogen B[a]P (benzo[a]pyren), i na jejich metabolizaci na látky snáze vyloučitelné z organismu. Účastní se i metabolismu steroidů, kde CYP1A1 katalyzuje 2-hydroxylaci estradiolu. Za jeden z nejúčinnějších induktorů rodiny CYP1 je považován tetrachlórdibenzo-p-dioxin (TCDD). [29] Na rozdíl od CYP1A1 se CYP1A2 podílí také na metabolizaci heterocyklických aromatických sloučenin a řady léčiv. [30] CYP1A1 je kontrolován aktivací Ah receptoru (AhR), neboli receptoru pro aromatické uhlovodíky. Po navázání ligandu na AhR dochází k jeho jaderné translokaci a dimerizaci, zdimerizuje s jaderným translokátorem pro AhR (ARNT). Vzniklý komplex AhR/ARNT se váže na specifická cílová místa, tzv. dioxinové responzivní elementy (DRE), v promotorech či enhancerových oblastech genu, což vede k aktivaci jeho transkripce. [31]

CYP3A4

Je nejvíce zastoupená forma CYP v lidských játrech, která zaujímá asi 30% veškerého CYP. Původně byl tento enzym nazýván podle schopnosti oxidovat nifedipin jako P450NF a pod tímto názvem byl také poprvé izolován. [32] Zprostředkování metabolismu a obecně přeměn endogenních steroidů převážně v játrech, střevě a mozku, byla zřejmě jeho původní role. Genová rodina 3A (CYP3A)

cytochormu P450 u člověka zahrnuje 4 geny, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP3A43, které jsou lokalizovány v tandemovém uspořádání na chromozomu 7. [33] Podrodina CYP3A usnadňuje eliminaci mnoha léčiv, dalších xenobiotik a endogenních molekul jako androgenů, estrogenů a vitamínu D, z těla. [35] CYP3A4 je u dospělého člověka dominantním enzymem v lidských játrech a tenkém střevě, je zapojen v metabolismu více než 50% klinicky užívaných léčiv, jako cyklosporin, nifedipin, erythromycin a endogenních látek. [34]

CYP1B1

Přestože byl CYP1B1 zařazen do rodiny CYP1, od ostatních členů této rodiny se liší řadou svých vlastností. Lidský gen CYP1B1 je lokalizován na chromozomu 2p22 – 21 a zahrnuje přibližně 8,5 – 12kb genomové DNA. [36]

CYP1B1 je největší známý lidský cytochrom P450, jak co se týče velikosti mRNA, tak počtu aminokyselin, avšak struktura jeho genu je paradoxně nejjednodušší. CYP1B1 ovlivňuje detoxikaci široké řady látek majících karcinogenní účinky na lidský organismus. Jedná se především o PAHs a halogenované aromatické uhlovodíky, jako jsou B[a]P, TCDD a DMBA, aromatické aminy a endogenní substráty – mastné kyseliny, steroidy, aj. CYP1B1 se také podílí na metabolismu steroidních hormonů. Katalyzuje přeměnu 17 β -estradiolu na 4-hydroxyestradiol. [37] Metabolit této reakce je genotoxický a může se kovalentně vázat na DNA a proteiny.

Důležitou roli v regulaci transkripce CYP1B1 hraje několik klíčových transkripčních faktorů, mezi které patří především AhR, protein CREB a estrogení receptory. Ve zdravé tkáni je CYP1B1 transkripčně aktivován cestou AhR, kde AhR představuje transkripční faktor, který je aktivován specifickými ligandy (TCDD, BaP, apod.) a reguluje expresi cílových genů. [38] Neaktivní AhR je lokalizován volně v cytoplazmě. Tam vytváří komplex spolu s proteiny tepelného šoku Hsp90 (heat shock proteins-90), proteinem XAP2 (X-associated protein 2) a p23. Tento neaktivní komplex je v cytosolu aktivován vazbou ligandu na specifické místo v AhR, tím dojde ke změně konformace AhR a k oddělení proteinových podjednotek, samotný AhR s navázaným ligandem vstupuje do jádra buňky. Tam může aktivovaný AhR s navázaným ligandem vytvořit dimer s proteinem ARNT (AhR nuclear translocator), který sídlí trvale v jádře. Komplex AhR/ARNT tvoří aktivní transkripční faktor, který se váže na xenobiotické (nebo také dioxinové) responzivní elementy (XRE/DRE),

specifické regulační oblasti v promotoru genu, jehož transkripce je aktivována pomocí AhR. Oblasti DRE v promotoru genu mohou vzájemně regulovat základní transkripci a inducibilitu AhR. [39]

Dalšími transkripčními faktory regulujícími expresi CYP1B1 jsou proteiny aktivované pomocí cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Jedním z nich je CREB (cAMP response element-binding) protein. Molekula cAMP ve spolupráci s dalšími látkami tento protein fosforyluje. Protein CREB, po vazbě specifického proteinu CBP, nasedá na specifické místo v promotoru genu a zahajuje transkripci příslušného genu. Vazebné místo pro protein CREB se nachází vedle steroidogenního faktoru 1(SF-1). Dalším proteinem aktivovaným pomocí cAMP je aktivační protein 1. Ten se po vazbě na specifické místo v promotoru AP-1, opět podílí na regulaci transkripce CYP1B1. Molekuly aktivované cAMP zprostředkovávají transkripci CYP1B1 především ve tkáních, kde nefunguje regulace pomocí AhR, jako jsou nadledvinky, varlata a vaječníky.

Transkripce CYP1B1 je regulována i prostřednictvím steroidních hormonů, konkrétně estrogenu. Ten se váže na estrogení receptor, který nasedá na specifické místo v promotoru genu, tzv. responzivní element (ERE). ERE může kooperovat se sousedním Sp1 místem v promotoru genu. Regulace prostřednictvím estrogenu částečně souvisí s regulací AhR. Je tedy důležitá pro maximální transkripci genu CYP1B1. Významnou roli hraje i v konstitutivní expresi CYP1B1, a to především v nádorových buňkách prsní tkáně. Funkce ER v nádorech regulovaných estrogeními hormony navíc koreluje s transformací estrogenu na 4-hydroxyestradiol, zprostředkovanou CYP1B1. Účinky estrogenu jsou tkáňově specifické, protože pouze u buněk s ER lze po stimulaci estrogenem pozorovat zvýšení exprese CYP1B1. [37]

Na regulaci transkripce mohou mít vliv i epigenetické faktory, jako je metylace či acetylace. Methylace promotoru může být spojena se snížením aktivity daného genu. Uskutečňuje se na mnohačetných místech uvnitř genu. Tyto metylace mohou být obsaženy i uvnitř klíčového promotorového elementu DRE a vazebného místa Sp1, a tím je mohou znepřístupnit pro proteiny účastníci se regulace cestou AhR. Dále tím mohou ovlivnit i regulaci exprese steroidními hormony. Klíčovou roli v transkripci genu CYP1B1 může hrát i změna struktury chromatinu, způsobená právě methylací či acetylací. Stupeň epigenetické regulace je tkáňově specifický. [40]

1.2.2. Hydroxysteroidní oxidoreduktázy/dehydrogenázy

Druhou skupinou jsou steroidogenních enzymů jsou hydroxysteroidní oxidoreduktázy popř. dehydrogenázy, které se vyskytují v několika formách, z nichž každá má svůj specifický gen, ze kterého je exprimována. Mají nezastupitelnou roli při steroidogenezi jak v gonádách, tak v kůře nadledvin. Patří do jedné ze dvou odlišných skupin- alkoholdehydrogenáz/reduktáz nebo do aldo-keto reduktáz. Steroidní dehydrogenázy využívají NAD^+/NADH nebo $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ jako kofaktory. [41]

3 β -HSD

Tento enzym katalyzuje především přeměnu 3 β -hydroxy-5-en-steroidů v 3-keto-4-en-steroidy a není kódován pouze jedním genem, ale může mít základ ve 2-3 homologních genech. Jako substrát může využít jak pregnenolon, tak 17-OH-pregnenolon, přecházející v progesteron, nebo DHEA při změně na androstandion. V lidské kůře nadledvin, všech jejích zónách, a Leydigových buňkách je exprimován pouze typ II. [42]

17 β -HSD

Enzym 17 β -HSD slouží jako 17-keto-steroidní reduktáza. Katalyzuje reverzibilní konverzi 17-keto a 17 β -hydroxy skupin v androgeny a estrogeny, včetně androstandionu, DHEA a 17 β -estradiolu. [43]

Obě tyto skupiny enzymů, P450 a oxidoreduktázy/dehydrogenázy, jsou nezbytné pro steroidogenezi v pohlavních žlázách, placentě a nadledvinách. [26]

1.2.3. Sulfotransferázy (SULT)

SULT patří stejně jako UGT k enzymům II. fáze metabolismu xenobiotik, které se také významnou měrou podílejí na metabolismu léčiv. Hlavní rolí těchto enzymů v metabolismu léčiv je tvorba příslušných sulfátů, které jsou vysoce hydrofilní a jsou velmi rychle eliminovány z těla močí. Ačkoliv hlavní role SULT spočívá v detoxifikaci léčiv, existují i případy, kdy SULT přispívají k aktivaci promutagenů, teratogenů a prokarcinogenů. [44] SULT přenáší vysoce polární sulfátovou skupinu z endogenního

látky 5'-fosfoadenosinu-3'-fosfosulfátu (PAPS) na příslušné endo- i exogenní substráty. [45]

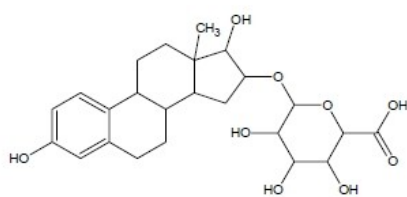
U savců můžeme rozlišit dvě skupiny SULT. První skupina lokalizovaná v buňkách v Golgiho aparátu se podílí na metabolismu endogenních látek (např. látek steroidní povahy), zatímco druhá skupina SULT lokalizovaných v cytosolu katalyzuje biotransformační reakce nízkomolekulárních endogenních látek (neurotransmitery) a rovněž xenobiotik. [46]

Doposud bylo identifikováno a do různé míry popsáno celkem 13 lidských SULT. [47] Mezi sulfotransferasy podílející se u člověka na metabolismu léčiv patří SULT1A1, SULT1A3, SULT1B1, SULT1E1 a SULT2A1. SULT1A1 je patrně nejvýznamnější jaterní SULT podílející se na metabolismu léčiv u člověka. SULT1A1 tvoří v játrech 50 % z celkového SULT proteinu. Naopak v tenkém střevě je exprese tohoto enzymu snížena na rozdíl od SULT1A3 a SULT1B1, které jsou ve střevní tkáni exprimovány ve zvýšené míře. SULT1A3 lze detekovat v játrech pouze v prenatálním období života, po narození exprese tohoto enzymu v játrech klesá na 0%. V případě SULT také nebylo provedeno doposud velké množství experimentů sledujících vliv cizorodých látek na enzymovou aktivitu (inhibice, indukce) ve srovnání s enzymy I. fáze metabolismu léčiv. Orální kontraceptiva jsou také substráty SULT a mohou narušovat vnitřní rovnováhu metabolismu endogenních estrogenů. [48] Aktivita sulfotransferáz stejně jako dalších enzymů metabolismu xenobiotik může být znásobena zvýšenou expresí příslušného enzymu. Exprese je i v případě sulfotransferáz ovlivněna interakcemi induktorů se skupinou transkripčních faktorů jako jsou AhR, glukokortikoidní receptor. [49] Mezi inhibitory SULT se řadí i přírodní látky flavonoidy, nejmocnějším inhibitorem se zdá být kvercetin. [50] Podobně jako UGT nebo CYP i SULT vykazují genový polymorfismus. Nagar a spol. zjistili, že genové varianty SULT1A1 * 1, SULT1A1 * 2, a také SULT1A1 * 3 mohou ovlivnit enzymovou aktivitu SULT1A1. [51]

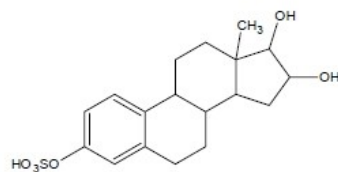
Odbourávání estrogenů

Hladiny cirkulujících hormonů u žen neurčuje jenom jejich tvorba, ale i rychlost odbourávání. Metabolické biotransformační pochody probíhají převážně v játrech, částečně v ledvinách a jiných tkáních. Estrogeny jsou dobře vstřebávány z gastrointestinálního traktu, podléhají enterohepatální cirkulaci. Syntetické estrogeny,

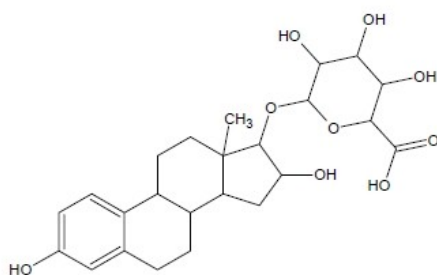
ve srovnání s přirozenými estrogeny, mají výrazně pomalejší degradaci, déle ovlivňují jaterní metabolismus. Steranový skelet je velmi stabilní a lze jej štěpit jen velmi obtížně. Proto dochází v játrech nebo v ledvinách k inaktivaci steroidů redukcí ketoskupin na hydroxyly (hydrogenací dvojné vazby) a následuje konjugace s kyselinou glukoronovou či s kyselinou sírovou. Aktivní steroidy jsou metabolizovány hydroxylací, redukcí keto skupin, tvorbou konjugátů rozpustných ve vodě, oxidací hydroxy skupiny a nasycením dvojné vazby. Mezi konjugáty rozpustné ve vodě patří sulfáty a glukuronidy. [52] 17β -Estradiol (E2) je rychle oxidován na estron (E1), který může být dále transformován na estradiol (E3), hlavní produkt vylučování. V moči a výkalech mohou být přítomny i další polární metabolity, jako jsou 16-hydroxy-estron, 16-ketoestron nebo 16-epiestriol. E2 je z těla odstraněn především jako konjugát. [53] Metabolity steroidních hormonů lze stanovit a využít je tak k diagnostice. [54]



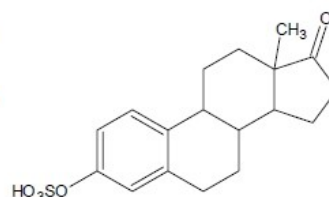
Obr. 36: Estriol-16 α-(β-D-glukuronid)



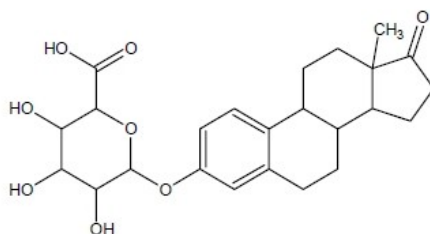
Obr. 37: Estriol-3-sulfát (E3-3S)



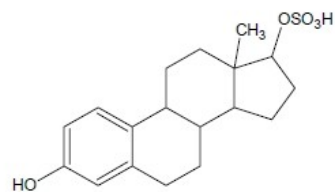
Obr. 38: Estriol 17-glukuronid



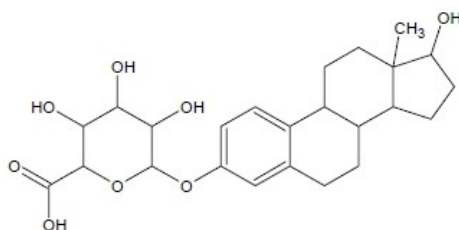
Obr. 39: Estron – 3 sulfát (E1-3S)



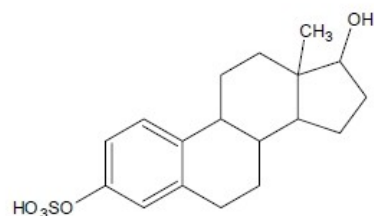
Obr. 40: Estrone 3-glukuronid



Obr. 41: Estradiol – 17 – sulfát



Obr. 42: Estradiol-3-glukuronid



Obr. 43: Estradiol 3-sulfát (E2-3S)

Obr. 5 Konjugované steroidní hormony (převzato z GAJDOVÁ, Hormony v odpadních vodách, 2009)

1.3. Fyziologické funkce estrogenů

Estrogeny mají trofický, růstový a diferenciační vliv na specifické cílové buňky. V pubertě navozují růst vnitřních pohlavních orgánů jako jsou vaječníky, vejcovody, děloha a pochva a zevních pohlavních orgánů (labia maiora a minora a klitoris). Dále stimulují růst a vývoj prsů (růst vývodného systému a ukládání tuků). Estrogeny mají vliv na rozvoj sekundárních pohlavních znaků, a to vlasové a chlupové linie typické pro ženu, ukládání tuků na predilekčních místech těla – prsa, boky, mons pubis, labia maiora. Ženský hlas díky nim zůstává výše položený. Při vývinu se podílejí na typickém utváření skeletu a ovlivňují jemnost pokožky. Vyvolávají proliferaci vaginálního dlaždicovitého epitelu, stimulují sekreci řídkého hlenu žlázkami krčku dělohy a mění konzistenci hlenové zátky děložního hrdla. V pohlavní dospělosti navozují proliferační fázi menstruačního cyklu. Estrogeny rovněž zvyšují citlivost ovarií na hormony adenohipofýzy a v cílových tkáních (děloha a mléčná žláza) zvyšují počet receptorů pro progesteron. Na počátku puberty, která u dívek nastupuje dříve než u chlapců, zvyšují aktivitu osteoblastů, a proto je u dívek nástup růstového zrychlení časnější. Později facilitují uzavírání růstových štěrbin více než testosteron, ženy mají proto nižší vzrůst než muži. Estrogeny též tlumí kostní remodelaci na úrovni zralých osteoklastů i na úrovni jejich prekurzorů – monocytů a stromálních buněk. Kromě přímého působení estrogeny příznivě ovlivňují kostní metabolismus i prostřednictvím aktivního metabolitu vitamínu D – kalcitriolu, jehož syntézu zvyšují. Přímo také ovlivňují resorpci kalcia ve střevě nezávisle na vitamínu D. Působí preventivně proti osteoporóze a kostní resorpci. Dále zvyšují zpětnou resorpci Na^+ a vody v ledvinách. Mají tlumivý vliv na erytropoetin, snižují erytropoezu a zvyšují krevní srážlivost. Snižují hladinu cholesterolu a β – lipoproteinů v plazmě, díky tomu mají estrogeny antiaterosklerotický účinek. Proto mají ženy ve fertilním období nižší výskyt kardiovaskulárních chorob. [55]

1.3.1. Klinický význam estrogenů

Více než polovinu života je organismus ženy exponován působení estrogenů. Ženské pohlavní hormony v průběhu života významně ovlivňují řadu tkání, orgánů i funkcí. V našich podmínkách dochází k menopauze mezi 50.–51. rokem. Ženy před menopauzou mají 2,5–4,5krát nižší relativní riziko úmrtnosti na kardiovaskulární

onemocnění a ICHS (ischemická choroba srdeční) než muži. U žen se ICHS manifestuje ve srovnání s muži o 10–15 let později. Příčiny nižší prevalence kardiovaskulárních onemocnění a ICHS u premenopauzálních žen jsou mnohočetné a spočívají především v ochranném působení estrogenů. Postmenopauzální koncentrace estrogenů pravděpodobně nedosahují prahových hodnot nutných k ochraně kardiovaskulárního systému ženy. [56]

Estrogeny mají ještě řadu dalších účinků. Studie na tkáňových kulturách a zvířecích modelech naznačily, že estrogeny mohou ovlivnit presenilní demenci Alzheimerova typu zásahem do metabolismu beta-amyloidu, inhibicí neuronální apoptózy; uvažuje se také o zvýšení aktivity cholinergního systému či aktivaci synaptogeneze a synaptické plasticity. Z klinických studií vyplývá, že postmenopauzální ženy mají oproti mužům zhruba 1,5–3krát vyšší riziko vzniku demence Alzheimerova typu. [57] Estrogeny zvyšují střevní resorpci vápníků. Zvyšují densitu kostní tkáně (o 2–4 % za rok) a dlouhodobě snižují výskyt fraktur podmíněných involuční osteoporózou. Po menopauze dramaticky narůstá riziko vzniku osteoporózy, které je 3–4krát vyšší než u mužů. [58]

Počet porodů, hormonální antikoncepce i HRT (hormonální terapie) jsou spojovány s 2–4krát vyšší frekvencí žlučové litiázy. Základním mechanismem vedoucím ke vzniku cholesterolové cholelitiázy je hypersaturace žluče cholesterolem. Cholesterol secernovaný do žluče pochází z HDL (high-density cholesterol), na žlučové kyseliny je konvertován cholesterol z LDL (light-density cholesterol). Progestiny zpomalují kontrakce žlučníku a motilitu žlučových cest a tím zvyšují nukleaci cholesterolu a zlepšují podmínky pro vznik kamenů. [58] Vliv estrogenů na parametry zánětu a imunitu doložily studie, které zaznamenaly vzestup CRP (C-reaktivní protein) a interleukinu-6 po podávání hormonální terapie. Estrogeny zvyšují buněčnou i hormonální imunitu. Ženy i samice experimentálních zvířat mají silnou imunitní reakci a snáze se vyrovnávají s infekčními chorobami. [59] Na druhé straně mají vyšší frekvenci autoimunitních a chronických zánětlivých onemocnění. [60]

1.4. Estrogeny a nádorové bujení

Rakovina je v současnosti celosvětově na druhém místě příčin úmrtí, hned po kardiovaskulárních onemocněních. Podle statistik [61] je zřejmé, že ve výskytu nových případů rakoviny jsou a budou nejvíce frekventována nádorová onemocnění

prsu a prostaty. Rakovina prsu, která je nejčastější rakovinou postihující ženy, zodpovídá každoročně za více než 400 000 úmrtí žen v celosvětovém měřítku. V obou případech, prsu i prostaty, se jedná o tkáně, které jsou v průběhu života silně exponovány steroidním hormonům. Můžeme tedy nalézt spojitost mezi karcinogenezí a steroidy.

Estrogeny jako sloučeniny ovlivňující některé mechanismy regulující buněčnou mitózu figurují hned v několika fázích procesu karcinogeneze. Tím, že estrogeny zrychlují proliferaci buněk, přímo ovlivňují rychlost vzniku spontánních mutací. Pokud navíc neúčinně funguje vnitřní i vnější proces eliminace poškozených buněk díky dalším mutacím, tak se může mutovaná buňka po několikaletém období progresu manifestovat jako již zřetelný nádor. [62]

Zvýšená koncentrace estrogenů ovšem potencuje proliferaci i nádorových buněk – estrogeny tak působí jako promotory, které přispívají k rozvoji nádorového procesu. V případě karcinomu prsu se právě estrogenům přisuzuje majoritní podíl v diferenciaci a proliferaci nádorově modifikovaných buněk, neboť mohou zvyšovat expresi cyklin- dependentních kináz, které fosforylací retinoblastomálního proteinu zrychlují přechod buněk z G1 do S fáze.[63]

Další efekt estrogenů spočívá i v jejich schopnosti zvyšovat expresi angiogenních růstových faktorů, které se pak starají o zvýšený přísun živin pro rostoucí nádor.

Při změně metabolismu estrogenů dochází k enzymatické poruše dehydrogenáz nebo katechol O metyl-trasferáz (COMT) a nastává hromadění a stabilizace produktů, které vytvářejí stabilní addukty s DNA, a takto mohou poškozovat genofond buňky. [64] Genetická variabilita v případě cytochromů je významný faktor, který zvyšuje riziko karcinomu prsu. Mutantní alela CYP1A1 souvisí se zvýšeným rizikem karcinomu prsu, prostaty, tlustého střeva a rekta a karcinomu plic u kuřáků. Mutace CYP1B1 zvyšuje riziko vývoje karcinomu prostaty, prsu a plic. Také mutace COMT jsou odpovědné za zvýšené riziko vývoje karcinomu prsu a dále se jim přičítá odpovědnost za vývoj dalších onemocnění jako Parkinsonova nemoc, schizofrenie a alkoholismus. Polymorfismus genů CYP 17 a CYP 1A1, 1B1 kódující enzymy účastnící se metabolismu estrogenů, zvyšuje incidenci karcinomu prsu až 4 krát. [65]

Vedle systémového vlivu ovariálních estrogenů se především v postmenopauzálním období života ženy uplatňuje vliv lokálně vzniklých estrogenů,

jejichž celkové produkované množství je velmi malé, avšak dosahuje poměrně vysokých lokálních koncentrací. Lokální tvorba se stává hlavním zdrojem estrogenů po menopauze a závisí především na množství tukové tkáně. [66] Ženy s vyšší hmotností po menopauze mohou být relativně více chráněny proti osteoporóze a zdá se, že i incidence Alzheimerovi nemoci je u těchto žen nižší ve srovnání s ženami štíhlejšími, stejného věku. Obezita je ovšem spojena s vyšším rizikem pro vývoj karcinomu prsu. [67]

Klíčovým zdrojem prekurzorů pro lokální tvorbu estrogenů je kůra nadledvin, která produkuje androstendion, dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfát (DHEAS). Před aromatizací prekurzorů na estron či estradiol musí být DHEA konvertován na androstendiol za účasti dehydrogenáz (17β -HSD III a II), které se nacházejí v tukové tkáni. Dalším krokem je redukce ketoskupiny na C17 na hydroxylovou, která je katalyzována 17 β -hydroxysteroidní dehydrogenázou typu I (17β -HSD I). Vysoká exprese tohoto enzymu byla nalezena v kostech a nádorech prsu. [68] [69]

Biosyntéza estrogenů je katalyzována aromatázami pod kontrolou genů CYP 19 a cytochromu P 450. Tento enzym a systém estron sulfatáz byly nalezeny ve tkáních nádorů prsu i v tukové tkáni prsu. Nádory prsu jsou tedy schopny aktivní tvorby estrogenů z okolních prekurzorů a jejich koncentrace v tumoru mnohonásobně převyšuje koncentrace v krvi. [70] Enzymová exprese je řízená tkáňově specifickými „promotory“, jejichž aktivita podmiňuje tkáňově rozdílnou intenzitu exprese aromatáz. Vysoká aktivita byla nalezena ve tkáni tumorů prsu, ale i v tukové tkáni z jejich okolí. Tudíž existuje komunikace mezi hormonálním stavem nádoru a jeho okolím. [71] Lokálně produkovaný estradiol hraje důležitější roli pro patofyziologii vývoje karcinomu prsu než estradiol z krevního séra.

Expresí aromatáz vykazuje výrazné regionální – tkáňové rozdíly. Různé cytokiny jejich expresi zvyšují (IL-6, TNF α) a nalezeno bylo též zvýšení nádorové exprese aromatáz vlivem faktorů řízených cAMP. Tumory prsu tedy stimulují expresi aromatáz v okolí stromatu prostřednictvím zvýšení adenylát cyklázy. Faktor, který toto zprostředkuje je prostaglandin PGE2. [72]

1.4.1 Estrogenové receptory a karcinom prsu

Je známo, že normální proliferující buňky prsu neobsahují ER α ani ER β . [73] Jestliže je tedy proliferace epitelu prsu indukována růstovými faktory, potom se zdá, že buňky obsahující ER neodpovídají dělením na vliv růstových faktorů. [74] Potom by úloha ER spočívala v inhibici exprese receptorů pro růstové faktory. Dominantním receptorem klidových buněk prsu je ER β . Proliferující buňky duktálního epitelu obsahovaly ER β v 30-47% a neobsahovaly ER α . V průběhu těhotenství potkanů přibližně 90% buněk obsahující ER β neproliferovalo, tudíž by tento receptor mohl mít antagonistickou funkci receptoru α . Varianta ER β CX u žen vykazovala velmi nízkou afinitu k estradiolu. Tato areceptivita vůči estrogenům se ztrácela až po heterodimerizaci s receptorem α . [75]

V průběhu laktace – v době vysoké diferenciaci epitelu dominuje ER α , která je exprimována až v 80%. ER α tedy není proliferacním receptorem, nýbrž receptorem diferenciaci epitelu. Nyní jsou známy již dva typy ER β , forma ER β 1, která váže estradiol, a varianta ER β ins, která estradiol neváže. Kombinací výše uvedených typů ER vzniká škála fenotypů ER s různými vlastnostmi, agonistickými i antagonistickými.

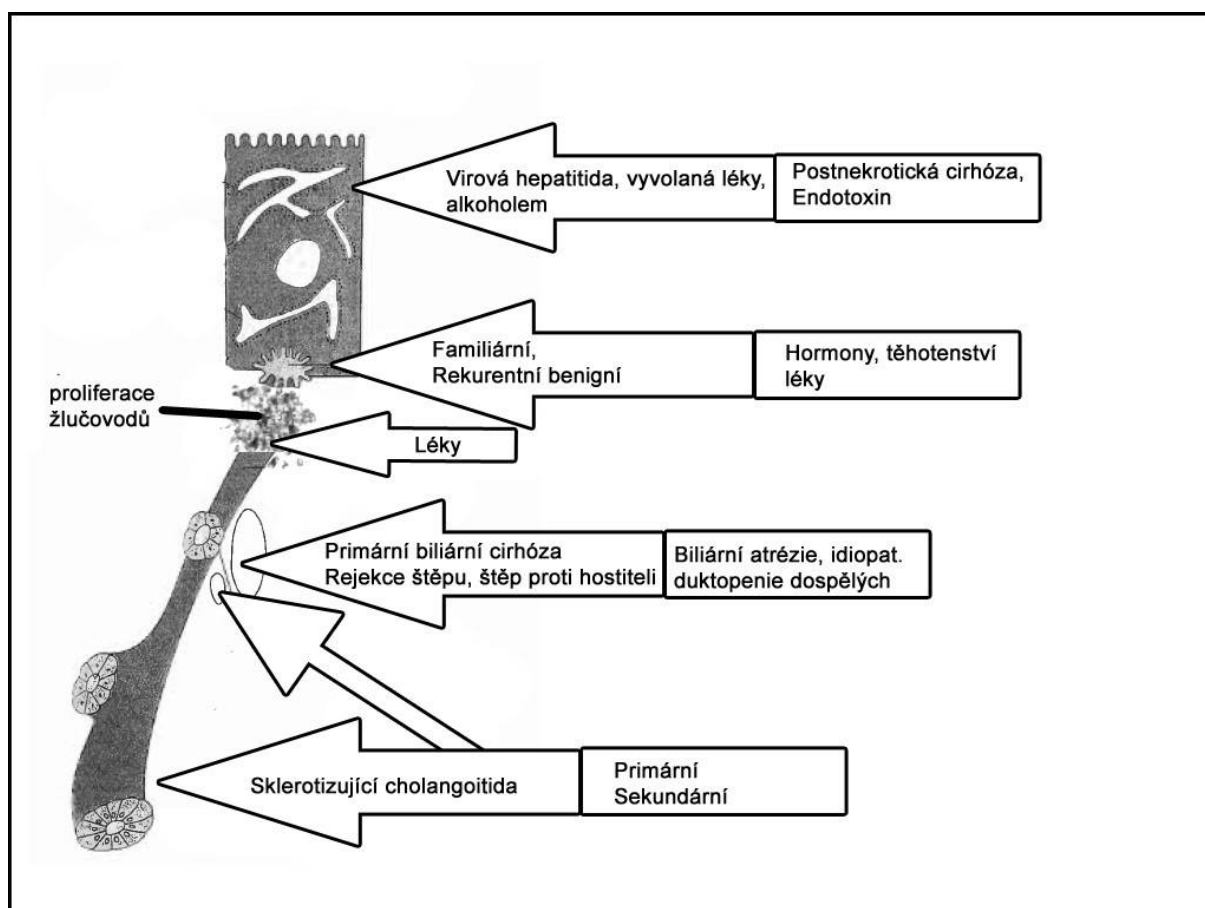
V nedávné době byla přehodnocena role hormonálních receptorů v normální tkáni prsu. Většina buněk, která zde proliferovaly, neobsahovaly ER α ani ER β . [73] Tato pozorování jsou v příkrém rozporu s nálezy ER α v buňkách nádorů prsu, které reagovaly na estradiol. Lze předpokládat, že reakce normální tkáně prsu na estradiol je odlišná od reakce tkáně nádorové. U zdravých postmenopauzálních žen byla efektivní chemoprevence tamoxifenem, je tedy pravděpodobné, že ženy, u kterých byl tamoxifen účinným již měly založené latentní klony nádorových buněk a tamoxifen jen oddálil jejich progresi. Co způsobuje progresi nádoru prsu u postmenopauzálních žen však není dosud přesvědčivě dokázáno.

1.5. Estrogeny a cholestáza

Cholestáza je stav, kdy je porušena tvorba a vylučování žluče anebo selhání schopnosti organismu dodat do duodena dostatečné množství žluče odpovídajícího složení. Může nastat od jaterní buňky až po Vaterovu papilu. Pokud je příčina uvnitř jaterního parenchymu (hepatocelulární nebo cholangiocelulární), mluvíme o

intrahepatální cholestáze. Mechanická překážka ve žlučových vývodech vede k extrahepatální (obstrukční) cholestáze a bývá spojena s akutními stavy. Neexistují však žádné laboratorní testy, které by byly schopné rozlišit intrahepatální a extrahepatální cholestázu. Symptomy bývají podobné, rozhodující vyšetření k rozlišení cholestázy jsou zobrazovací vyšetřovací metody. Z klinického hlediska lze cholestázy dělit do 4 skupin.

- nezánnětlivé cholestázy – jsou vyvolávány hormony, léky, sepsí, do této skupiny patří i intrahepatální cholestáza těhotných (ICP), dědičné poruchy sekrece žluči, paraneoplastické cholestázy.
- zánětlivé cholestázy – cholestatické virové hepatitidy, alkoholická cholestáza
- cholestázy při poškození žlučovodů
- mechanické cholestázy [76]



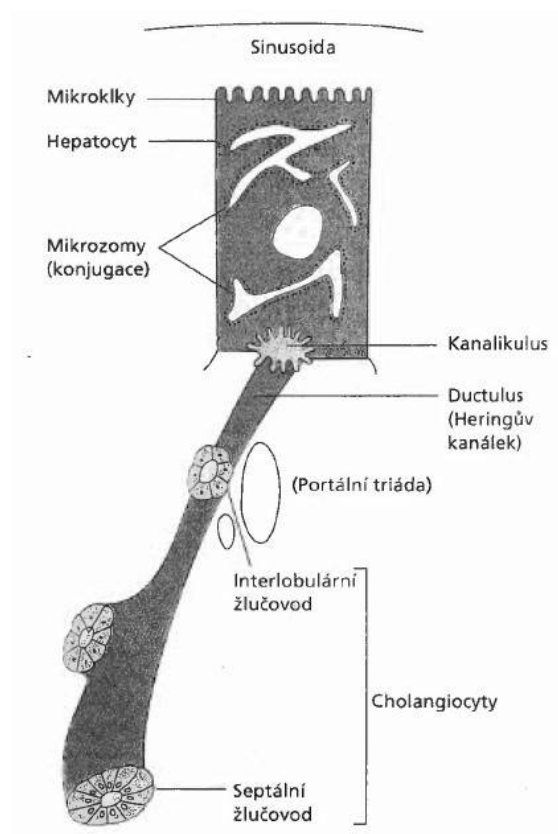
Obr. 6 dělení intrahepatální cholestázy dle možných míst postižení v žlučovém systému (převzato z SHERLOCKOVÁ S., Nemoci jater a žlučových cest, 2004)

1.5.1. Anatomie žlučového systému a vylučování žluči

Žlučové soli, konjugovaný bilirubin, cholesterol, fosfolipidy, proteiny, elektrolyty a voda jsou vylučovány jaterní buňkou do kanalikulu. Žlučový sekreční aparát obsahuje kanalikulární membránu s vlastními proteinovými nosiči, intracelulární organely a buněčnou kostru hepatocytu. Velmi těsné spoje oddělují žlučový prostor od krevního. Žlučové kanalikuly se vlévají do kanálků, které se nachází hlavně v portálních jaterních zónách. Kanálky ústí do interlobulárních žlučovodů, které jsou doprovázeny větví jaterní arterie a portální žíly. Kanálky se vzájemně spojují a vytvářejí septální žlučovody a nakonec vytvoří dva hlavní jaterní vývody. Drobné žlučové kanalikuly distálně od Heringových kanálků jsou vystlané 4 či 5 cholangiocyty.

Vylučování žluči je poměrně nezávislé na perfuzním tlaku. Žluč se tvoří v hepatocytech a je modifikována cholangiocyty. Celkový tok žluči je u člověka asi 600 ml za 24 hodin. Přejít konjugovaných žlučových solí do žlučového kanalikulu je nejdůležitějším faktorem podporujícím tvorbu žluči. Jde o frakci závislou na žlučových solích. Voda následuje osmoticky aktivní žlučové soli a existuje těsný vztah mezi tokem žluči a vylučováním žlučových solí.

Buněčný mechanismus probíhá v hepatocytu, který je polarizovanou buňkou sekrečního epitelu s bazolaterální (sinusoidální a laterální) a apikální (kanalikulární) membránou. Tvorba žluči probíhá díky adsorpci žlučových kyselin a jiných iontů přes bazolaterální (sinusoidální) membránu, přenos hepatocytem a vylučování přes kanalikulární membránu. Sekreční proces závisí na přítomnosti sady transportních proteinů v bazolaterální membráně a druhé sadě v kanalikulární membráně. Celý mechanismus je poháněn $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázou}$ v bazolaterální membráně, která udržuje chemický gradient a potenciálový rozdíl mezi hepatocytem a jeho okolím. Díky nerovnováze elektrického náboje je nitro hepatocytu záporné v porovnání s vnějším prostorem a proto přitahuje kladně nabitě ionty a záporné odpuzuje. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáza}$ se nenachází na kanalikulární membráně. Tento přenašeč je mezi jinými ovlivněn změnami v membránové fluiditě. [77]



Obr. 7 Anatomie intrahepatálního žlučového systému(převzato z SHERLOCKOVÁ S., Nemoci jater a žlučových cest, 2004)

Sinusoidální záchyt

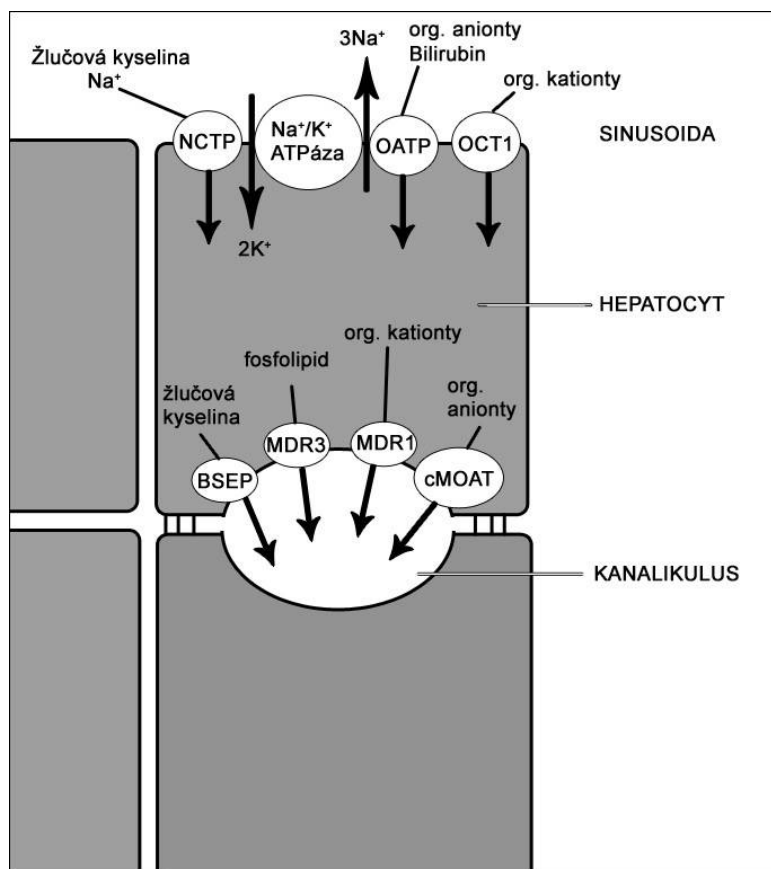
Na sodíku závislý taurocholátový kotransportní protein (NTCP) přenáší žlučové kyseliny konjugované taurinem či glycinem. Organický aniontový transportér (OATP) není závislý na sodíku a přenáší několik molekul včetně žlučových kyselin, bromsulftaleinu a další organické anionty. Dále je zde organický kationový přenašeč (OCT). Další iontové transportéry na povrchu hepatocytu jsou : výměnný $\text{Na}^+\text{-H}^+$ transportér, který udržuje intracelulární pH. $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ kotransportér vykonává podobnou funkci. Bazolaterální membrána obsahuje mechanismy pro absorpci sulfátu, neesterifikovaných mastných kyselin a organických kationů a je zde přítomná řada transportérů, kterými je v případě cholestázy zprostředkován opačný transport ze žluče do krevního řečiště.

Intracelulární transport

Cytozolické proteiny jsou zapotřebí pro transport žlučových kyselin buňkou. Nejdůležitější protein je dehydrogenáza 3- α -hydroxysteroidu. Golgiho aparát a endoplasmatické retikulum se též nejspíše účastní přenosu kyselin.

Kanalikulární sekrece

Kanalikulární membrána obsahuje transportéry zodpovědné za přenos molekul do žluči oproti vysokým koncentračním gradientům. Jsou v ní také enzymy alkalická fosfatáza, γ -glutamyl transpeptidáza a další. Tyto přenašeče jsou závislé na ATPáze. Kanalikulární multispecifický organický aniontový transportér (cMOAT, známý také jako MRP-2) přenáší glukuronid a diglukuronid bilirubinu. Kanalikulární exportní pumpa žlučových solí (BSEP) přenáší žlučové soli. Protein mnohočetné rezistence vůči lékům 1 (MDR 1) je transportérem hydrofobních organických kationtů. MDR 3 je fosfolipidový translokátor, který působí jako flipáza pro fosfatidycholin a je potřebný pro sekreci fosfolipidů do žluče. Voda a anorganické se dostávají do kanalikulární žluče difuzí přes těsné spoje pomocí osmotického gradientu. Vylučování žluče je ovlivněno mnohými hormony a též cAMP a proteinkinázou C.



Obr. 8 Hlavní transportní systémy v tvorbě žluči (převzato z SHERLOCKOVÁ S., Nemoci jater a žlučových cest, 2004)

Při cholestáze postihují cytoskelet a membrány hepatocytu léky, hormony a sepe. Kromě poškození jater cholestázou se projeví změny i na jiných orgánech. Slezina je zvětšená a tuhá, ledviny jsou zvětšené a obarvené žlučí, kde v distálních tubulech a sběracích kanálcích se nachází bilirubinové válce. [77]

Klinické příznaky cholestázy

Hlavními příznaky jsou svědění a malabsorpce. Pruritus je připisován retenci žlučových kyselin. Únava je především příznakem u pacientů s chronickou cholestatickou chorobou jater. Steatorea vzniká následkem nedostatečného množství žlučových solí ve střevě, nutných pro absorpci tuků z potravy a vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Xantomy se vyvinou u chronické cholestázy, ale již nejsou tak častým příznakem. Onemocnění kostí je komplikací chronického jaterního onemocnění, mohou se objevit bolesti a zlomeniny kostí. Hromadění mědi v játrech doprovází zejména chronické formy cholestázy. Jaterní encefalopatie je terminálním příznakem.

1.5.2. Biochemické testy při cholestáze

Všechny komponenty žluči jsou v séru zvýšené. Hladina konjugovaného bilirubinu v séru je nad normálními hodnotami. Když je cholestáza odstraněna, bilirubin pozvolna klesá k normálním hodnotám. Alkalická fosfatáza v séru je většinou 3x nad normální hodnoty. Sérová γ -glutamyl transpeptidáza vzroste. Hladina těchto enzymů je vysoká z důsledku vyšší syntézy a uvolňování enzymů z jaterních a žlučových plasmatických membrán. Může být vzestup i celkového cholesterolu v séru. Nárůst sérových lipoproteinů je díky frakci o nízké denzitě, naproti tomu HDL je snížený. Hladiny albuminu a globulinu v séru jsou v akutních případech na normálních hodnotách. V moči je přítomen konjugovaný bilirubin. [77] [76]

Aminotransferázy ALT, AST

V oblasti testů prostupnosti a integrity membrán, které vypovídají o funkčním stavu a integritě celé jaterní buňky, se považuje stále za nejcitlivější a nejrychleji vypovídající stanovení aminotransferáz

Aspartátaminotransferáza neboli AST, L-aspartát:2-oxoglutarátaminotransferáza, je enzym přenášející aminoskupinu z aspartátu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a oxalacetátu. AST je přítomna v srdečním a kosterním svalu, ledvinách, játrech, pankreatu, slezině, plicích a erytrocytech. Enzym je bilokulární, nachází se v mitochondriích a v cytoplasmě. Oba izoenzymy prostupují za fyziologických okolností v malé míře do krevního řečiště a cirkulují v něm s poločasem zhruba 18 hodin.

Úlohou alaninaminotransferázy neboli ALT, L-alanin:2-oxoglutarátaminotransferáza, je přenos aminoskupiny z alaninu na oxoglutarát za vzniku glutamátu a pyruvátu. Enzym je přítomen ve stejných tkáních jako AST, nejvíce je ho však v játrech a ledvinách. Je to unilokulární enzym, vyskytuje se pouze v cytoplasmě. Z buněk se enzym uvolňuje do cirkulace, kde jeho poločas činí asi 48 hodin. Koenzymem AST i ALT je pyridoxal-5'-fosfát (PDP). V krvi se může AST i ALT vyskytovat i bez tohoto koenzymu, což se projeví sníženou celkovou aktivitou. V purifikovaných tkáňových extraktech a v referenčních sérových materiálech pak chybí PDP zcela. Z těchto důvodů se při stanovení katalytické koncentrace AST i ALT do reakčních směsí přidává standardní množství PDP.

Stanovení obou transamináz se nejčastěji provádí kontinuální spektrofotometru založenou na principu spřažení transaminázové reakce s dehydrogenázovou reakcí, jejímž koenzymem je nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺/NADH). Měří se změna absorbance NADH v čase.

Referenční rozmezí katalytické koncentrace AST a ALT (37 °C, reakce s přídatkem pyridoxal-5'-fosfátu je fS-AST do 0,66 μ kat/l a fS-ALT do 0,73 μ kat/l. Při interpretaci vyšetření transamináz platí, že zvláště ALT je citlivým indikátorem poruchy prostupnosti membrán hepatocytu, již pouhé omezení přívodu živin způsobené stagnací krve v játrech při kardiální insuficienci způsobí vyplavení enzymu z buněk. Pro účely posouzení hloubky postižení hepatocytu a prognosticky

užitečným vodítkem zůstává i nadále poměr AST:ALT (obě v $\mu\text{kat/l}$, neboli de Ritisův koeficient). Hodnoty vyšší než 0,7-1,0 jsou prognosticky závažnější a svědčí pro rostoucí podíl buněčných nekróz. [78]

Alkalická fosfatáza ALP

Celková katalytická aktivita ALP (fosforylázová monoesterů kyseliny orthofosforečné) v séru se za normálních okolností skládá převážně z aktivity kostního, jaterního a střevního izoenzymu, v těhotenství též placentárního izoenzymu. K tomu přibývají aktivity různých dalších molekulových forem vzniklých posttranslačními změnami enzymu. ALP katalyzuje hydrolýzu fosfátových monoesterů v alkalickém prostředí a z toho vychází i celkové stanovení ALP. Jako substrát se používá 4 – nitrofenylfosfát, z něhož se v enzymové reakci uvolňuje 4 – nitrofenol. Ten je v alkalickém prostředí žlutý a jeho koncentrace se stanovuje fotometricky.

Aktivitu ALP ve vzorku inhibuje citrát, EDTA a oxalát, zvyšuje ji naopak hemolýza. Spektrofotometrické stanovení ruší hemoglobin a bilirubin. Z preanalytických podmínek je dále významné, že podávání některých léků zvyšuje (antibiotika, kontraceptiva, anabolika, morfin, methyldopa, kolchicin aj.), nebo naopak snižuje (kortikoidy, D-vitamin, albumin, některé aminokyseliny aj.) celkovou ALP. Referenční rozmezí katalytické koncentrace celkové ALP v séru je (fS-ALP, $\mu\text{kat/l}$, N-methylglukaminový pufr, 37 °C) je u dospělých 0,6 – 2,6 $\mu\text{kat/l}$.

Při interpretaci hodnot katalytické koncentrace celkové ALP je nezbytné zejména získání dynamického obrazu o pohybu hodnot, identifikace izoenzymů a srovnání s výsledky jiných testů. Nejčastější příčinou 3-5 krát zvýšené celkové ALP je cholestáza při litiáze a nádorové obstrukci a intrahepatální cholestáze. Aminotransferázy ALT a AST přitom bývají jen lehce a přechodně zvýšené. [78]

Bilirubin

Rutinní stanovení bilirubinu v séru je založeno na Van den Berghově diazoreakci. V této reakci se kopuluje bilirubin s diazotovanou kyselinou za vzniku fotometricky kvantifikovatelného azobarviva, které je v zásaditém prostředí modrozelené a v kyselém prostředí červené. Konjugovaný bilirubin reaguje rychle,

reakce nekonjugovaného bilirubinu probíhá pomalu, ale urychluje ji přídavek akceleratorů, které uvolní bilirubin z vazby na albumin. Z rozdílu výsledných hodnot paralelních stanovení s akcelerátorem a bez akceleratoru se vypočítá koncentrace nekonjugovaného bilirubinu.

Preanalytické podmínky vyšetření bilirubinu jsou poměrně náročné. Sérum pro analýzu nesmí být hemolytické ani chylózní a je jej třeba chránit před slunečními paprsky i před umělým světlem a materiál je nutno zpracovat co nejdříve po odběru. Také analýza se musí provádět za nepřímého osvětlení, neboť intenzita zbarvení azobilirubinu na světle klesá asi o 10 % během 15 minut. Vyšetřování hladiny bilirubinu ruší současné podávání erytromycinu, oxacilinu, nitrofurantoinu, indometacinu, fenothiazinu, vitamínu K, vitamínu B₂ a kontrastních rtg látek.

Při interpretaci výsledků vyšetření bilirubinu v séru je třeba znát, že jeho vylučování patří mezi funkce, které selhávají až při velmi těžké poruše jater. Současně s hyperbilirubinemií pak bývají přítomny i další známky poškození jaterního parenchymu. Mírná izolovaná nekonjugovaná hyperbilirubinémie bez klinických příznaků a zvýšení jiných testů je typická pro familiární benigní hyperbilirubinémie Gilbertova typu. Intrahepatální cholestáza mívá hodnoty bilirubinu v séru pouze do 150 $\mu\text{mol/l}$. [78]

Rozmezí fyziologických hodnot koncentrace bilirubinu v séru je u dospělých 3,4 – 17,1 $\mu\text{mol/l}$.

C – reaktivní protein CRP

C–reaktivní protein (CRP) je protein akutní fáze, který je normálně přítomen v séru zdravých lidí v nízkých koncentracích. Během zánětlivého procesu při bakteriální infekci, ve spojitosti s poškozením tkání a po operaci koncentrace CRP znatelně stoupají. Zvýšené koncentrace CRP jsou detekovány během 6 – 12 hodin po začátku zánětlivého procesu. CRP je obvykle zvýšen bakteriální infekcí, ale ne virovou, což lze použít jako základní pomůcku pro rozlišení bakteriální a virové infekce.

CRP je cyklický pentamérový sérový protein s relativní molekulovou hmotností přibližně 120 kD. Má pět identických nekovalentně vázaných podjednotek, každá o velikosti 206 aminokyselin. Je syntetizován v játrech a epiteliálních buňkách za stimulace zánětlivých lyfokinů (interleukin–6, interleukin–1, tumorového

nekrotizujícího faktoru). CRP náleží do rodiny pentraximů, kalcium vázajících oligometrických proteinů. CRP jako součást nespecifického imunitního obranného mechanismu, který je schopný vázat pneumokokový kapsulární C polysacharid, fosfocholinové skupiny membránových zbytků, stejně jako chromatin v přítomnosti Ca^{++} iontů, je schopný aktivovat klasickou cestu komplementu a má funkci jako opsonin v leukocytové fagocytóze, stimulaci lymfocytů nebo aktivaci monocytů/makrofágů. CRP také zvyšuje produkci tkáňového faktoru u makrofágů. [79]

Ke stanovení CRP se používá nejčastěji imunoturbidimetrická metoda. Vzorek (sérum nebo plazma) se inkubuje v přítomnosti specifické protilátky proti lidskému CRP (antisérum, monoklonální protilátky) a míra imunoprecipitace se kvantifikuje turbidimetricky při vlnové délce 700 (340) nm.

Celková bílkovina TP

Plazmatické proteiny jsou syntetizovány především v játrech, plazmatických buňkách, lymfatických uzlinách, slinivce a v kostní dřeni. V případě onemocnění dochází ke změnám v koncentraci celkového proteinu a rovněž v procentuálním zastoupení jejich jednotlivých frakcí oproti běžnému stavu. Hypoproteinémie může mít původ v onemocněních a poruchách, jako jsou ztráta krve, sprue, nefrotický syndrom, těžké záněty, syndrom retence solí a kwashiorkor (akutní deficit proteinu). Hyperproteinémie se může objevit v případech závažné dehydratace a obtíží, jako je mnohočetný myelom. Změny v relativním procentuálním zastoupení plazmatických proteinů mohou být způsobeny i změnou v jedné proteinové frakci. Často však nedochází v těchto případech ke změnám množství celkového proteinu. Poměr albuminu a globulinů je obvykle používán jako index rozdělení albuminu a globulinových frakcí. Patrné změny tohoto poměru lze zaznamenat u jaterní cirhózy, glomerulonefritidy, nefrotického syndromu, akutní hepatitidy, lupus erythematosus a rovněž při některých akutních a chronických zánětech. Stanovení celkového proteinu je užíváno při diagnostice a léčbě mnoha onemocnění postihujících játra, ledviny nebo kostní dřeň a při dalších metabolických nebo výživových onemocněních. Sérum nebo plazmu je třeba oddělit do 4 hodin od krevní sraženiny nebo buněk. Koncentrace celkového proteinu je o 0,4 až 0,8 g/dL nižší při odběru od ležícího

pacienta než u stojícího. Referenční rozmezí hodnot je u dospělých Dospělí: 6,6-8,7 g/dL (66-87 g/L). [80]

Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou nejvíce zastoupenou organickou složkou žluči. Mají základní význam při tvorbě micel ve střevě a při trávení a vstřebávání lipidů. Hrají ústřední roli při odstraňování cholesterolu z organismu, a podporují významnou měrou sekreci žluči.

Primární žlučové kyseliny, kyselina cholová a chenodeoxycholová, vznikají v hepatocytech syntézou z cholesterolu. Je to sled reakcí, v němž je klíčovým krokem určujícím rychlost syntézy 7 α -hydroxylace cholesterolu. Regulace probíhá zpětnou vazbou: vysoká koncentrace žlučových kyselin brzdí jejich syntézu a podporuje jejich sekreci do žluče. Žlučové kyseliny se potom na svém karboxylovém konci konjugují s aminokyselinami glycinem nebo taurinem. Konjugace zvýší polaritu původních žlučových kyselin a ze dvou primárních nekonjugovaných kyselin poskytne 4 primární konjugované kyseliny: glykocholovou, taurocholovou, glykochenodeoxycholovou a taurochenodeoxycholovou. Glycinové konjugáty převažují nad taurinovými. Ve žluči se téměř nevyskytují nekonjugované žlučové kyseliny.

Konjugované žlučové kyseliny secernované žlučí do duodena prodělávají účinný enterohepatální oběh. Prvním mechanismem je aktivní resorpce žlučových kyselin, zejména polárnějších taurokonjugátů, jež probíhá v dolní části ilea a je zprostředkována transportním proteinem IBAT (Ileal Bile Acid Transporter). Druhým mechanismem je pasivní difúze především méně polárních glykokonjugátů v jejunu a v tlustém střevě.

Během pasáže distálním ileem a tlustým střevem podstupují primární konjugované žlučové kyseliny působením enzymů endogenní střevní flóry dekonjugaci a dehydrogenaci (oxidaci) a následnou redukci, tím vznikají tak sekundární žlučové kyseliny, deoxycholová a lithocholová . Také ty se ze střeva resorbují a zařazují se do enterohepatálního oběhu. V játrech se dekonjugované žlučové kyseliny znovu konjugují s glycinem a s taurinem a jsou secernovány do žluči. Hepatotoxická kyselina lithocholová se při průchodu játry přeměňuje na netoxickou terciární kyselinu 3-sulfolithocholovou. Kyselina 7-oxolithocholová je

v játrech redukována na rovněž terciární kyselinu ursodeoxycholovou, která je 7 β -epimerem kyseliny chenodeoxycholové a která se ve farmakologických dávkách používá k léčbě řady cholestatických onemocnění jater. V krvi se žlučové kyseliny transportují vázané na bílkoviny. V portální krvi je koncentrace žlučových kyselin vysoká, zdravá játra však z ní dokáží během jediného průtoku odstranit až 80 % kyseliny cholové a až 60 % kyseliny chenodeoxycholové, a to v širokém rozsahu koncentrací. Tato schopnost patří k citlivým ukazatelům jaterní funkce. V systémovém krevním oběhu je koncentrace žlučových kyselin relativně nízká: okolo 6 $\mu\text{mol/l}$. Hladina žlučových kyselin v periferní krvi se do dvou hodin po jídle přechodně zvyšuje asi o 50%. [78]

Tato metodika platí pro kvantitativní enzymatické stanovení žlučových kyselin v séru při 530 nm. Extrémně chylózní a ikterická séra mohou způsobit nepřesné výsledky, v tomto případě je nutné ředění. Vzorky sér jsou skladovány maximálně 1 měsíc při - 20°C.

1.5.3. Intrahepatální cholestáza těhotných

U predisponovaných žen mohou estrogeny způsobit reverzibilní intrahepatální cholestázu. Známé jsou případy tohoto onemocnění v těhotenství (ICP), při hormonální substituční terapii či u žen užívajících antikoncepci. K manifestaci po užití antikoncepce dochází zpravidla do několika měsíců po nasazení antikoncepce, prognóza je dobrá, cholestáza ustupuje do dvou měsíců po vysazení hormonální léčby.

ICP je formou cholestázy vyskytující se nejčastěji v pozdním těhotenství a přetrvávající do porodu. Incidence ICP se celosvětově liší, nejvyšší počty případů uvádí statistiky z Chile (14%) a Bolívie (9,2%). V Evropě se onemocnění nevyskytuje tak často, nejvyšší incidence bývá popisována okolo 1 % těhotných žen. [81] ICP je často rodinné onemocnění, vykazující mendelovskou dominantní dědičnost. Prognóza pacientek bývá příznivá, žloutenka je zřídka silná. Moč je tmavá, stolice světlá. Značná může být malabsorpce tuků a svědění. V séru mají pacienti zvýšené hodnoty konjugovaného bilirubinu a alkalické fosfatázy. Hodnoty transamináz v séru jsou normální nebo lehce zvýšené. Hodnoty žlučových kyselin v séru jsou zvýšené a převažují primární kyseliny. Po porodu se všechny hodnoty vracejí k normálu. O to více je však závažnější vliv ICP na plod. Je zvýšená incidence fetálního distresu,

zkalené plodové vody a intrauterinního odumření plodu. Příčiny intrauterinního odumření plodu ještě nejsou dosud úplně objasněny. U plodů však nacházíme zvýšené hladiny žlučových kyselin v amniální tekutině, ve vzorcích pupečnickové krve a v mekoniu, svědčící o zvýšeném transportu žlučových kyselin od matky k plodu. [82] Přístup porodníka musí být pečlivý, doporučují se pravidelné týdenní odběry krve ke kontrole hladin žlučových kyselin, transamináz, bilirubinu a kardiotokeografické monitorování plodu od 34. týdne těhotenství. V případě závažné formy je potřeba zvážit vyvolání předčasného porodu ve 36. týdnu těhotenství, u mírnější podoby v 38. týdnu. Pacientky s ICP však mají samy sklon k předčasným porodům, který je způsoben zvýšenou sensitivitou myometria na oxytocin. [83]

Patogeneze ICP

V patogenezi onemocnění hraje klíčovou roli genetická predispozice a hormonální faktory. Onemocnění začíná obvykle v posledním trimestru, což je období nejvyšší koncentrace hormonů produkovaných placentou. Onemocnění se vyskytuje častěji u vícečetného těhotenství, které je doprovázeno vyššími hladinami těhotenských hormonů. ICP ustupuje krátce po porodu, kdy se hladiny hormonů vracejí k normě. V následných těhotenstvích se onemocnění znovu objevuje u 45 – 70% pacientek.

Při pokusech na zvířatech byl prokázán cholestatický efekt estrogenů, zvláště jejich konjugátů s kyselinou glukuronovou, jako je estradiol 17beta-glukuronid, které snižují vychytávání žlučových kyselin na sinusoidální membráně hepatocytu inhibicí transportních proteinů NTCP, OATP. Estrogeny snižují fluiditu sinusoidální membrány a aktivitu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázy}$. Snížený sodíkový gradient ovlivňuje funkci na sodíku závislého taurocholátového kotransportního proteinu (NTCP). Na kanalikulární membráně hepatocytu je exkrece konjugátů estrogenů do žluče uskutečňována exportní pumpou označovanou jako MRP 2 (cMOAT). Tyto metabolity se na téže pólu hepatocytu podílejí na zkřížené inhibici exportní pumpy žlučových kyselin (BSEP). Biotransformace estrogenů v játrech představují konjugaci se sulfáty a glukuronidy. Tyto detoxikační reakce snižují cholestatický efekt estrogenů. U pacientek s ICP převažuje tvorba více cholestatických glukuronidů nad sulfáty. [84]

Další roli v patogenezi ICP mají gestageny, progesteron se váže a ovlivňuje aktivitu fosfolipidového translokátoru (MDR 3). [85] Genetické faktory jsou též součástí patogeneze tohoto onemocnění. U predisponovaných žen se vedle hormonálních a genetických faktorů pravděpodobně uplatňují také alimentární vlivy a vlivy prostředí, které mohou zvýšit riziko vývoje ICP. [86]

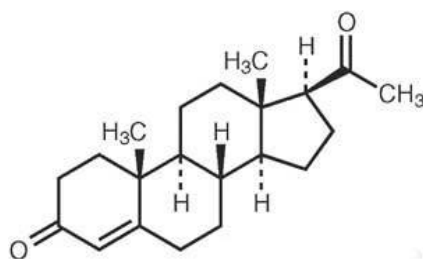
Léčba ICP

Kyselina ursodeoxycholová(UDCA) je přirozeně se vyskytující hydrofilní žlučovou kyselinou, která je s úspěchem podávána u řady cholestatických syndromů. [87] UDCA u ICP zvyšuje hepatobiliární sekreci žluči, chrání cholangiocyty před cytotoxicitou hydrofobních žlučových kyselin a hepatocyty před apoptózou indukovanou žlučovými kyselinami. Zablokování glukuronidace pomocí UDCA může být jedním z mechanismů, kterým lék působí proti cholestáze vyvolané estrogyny. S-adenosyl-L-methionin (SAME) byl zkoušen v léčbě nemocných s cholestatickými onemocněními, především u ICP. Byl prokázán jeho pozitivní vliv na pruritus i na biochemické parametry. Efekt by měl být především díky jeho antioxidačním účinkům a zlepšením membránové fluidity, stejně tak jako facilitace sulfatace 17 β -estradiolu, čímž zabraňuje jeho cholestatickému působení u pacientek s ICP. Zatím chybí ověření těchto výsledků v dalších studiích.

Silymarin působí v experimentech proti cholestatickým účinkům estradiol 17 β -glukuronidu či monohydroxy žlučovým kyselinám zvýšením cholerézy. Kromě těchto účinků také stimuluje alternativní dráhy biotransformace žlučových kyselin v játrech, jako je např. 6 α -hydroxylace. Výsledky klinických studií jsou však nejednoznačné. [76]

1.6. Progesteron

Progesteron je C₂₁ steroid produkovaný žlutým tělískem, placentou a v malých množstvích folikuly. Je významným intermediárním produktem při biosyntéze steroidních hormonů ve všech steroidních tkáních. Nejdůležitějšími cílovými orgány pro progesteron jsou děloha, prsy a mozek. Látky, které simulují jejich působení, se nazývají gestageny či progestiny a jsou používány spolu se syntetickými estrogyny jako perorální antikonceptiva.



Obr. 9 Progesteron (převzato z www.glowm.com/?p=glowm.cml/section_view&articleid=101)

1.6.1. Syntetické estrogény

Ethynilderivát estradiolu je silným estrogenem, který je účinný při perorální aplikaci, protože je odolný vůči jaternímu metabolismu.

Diethylstilbestrol a řada příbuzných sloučenin mají estrogenový účinek zřejmě proto, že jsou přeměňovány v těle na steroidům podobné sloučeniny. [3]

1.6.2. Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou nesteroidní rostlinné složky schopné vyvolávat estrogenní efekt. Obvykle se rozdělují na izoflavony (daidzein, genistein, biochanin A, formononetin, glycitein, atd.), lignany (secoisolariciresinol-diglucosid, matairesinol – prekursor savčích lignanů enterodiolu a enterolactonu) a kumestany. Izoflavony mají výrazně vyšší (pětinásobnou) afinitu k estrogennímu receptoru beta než k receptoru alfa. Fytoestrogeny mají asi 10tisíckrát nižší estrogenní efekt než estradiol. Ve srovnání s hormonální terapií to znamená vyšší bezpečnost, ale i nižší účinek. Vedle selektivních estrogenních účinků je jim přičítána i schopnost redukce volných radikálů s teoretickým kanceroprotektivním vlivem prostřednictvím útlumu tyrozinkináz. [88]

Hlavním zdrojem fytoestrogenů je sója (genistein, daidzein), červený jetel (formononetin, biochanin) a olejnatá semena např. Inu (lignany). Izoflavony z červeného jetele mají afinitu k estrogenovému a progesteronovému receptoru. In

vitro jsou schopny inhibice aromatázy. Genistein a biochanin jsou kompetitivními inhibitory 5-alfareduktázy. [89]

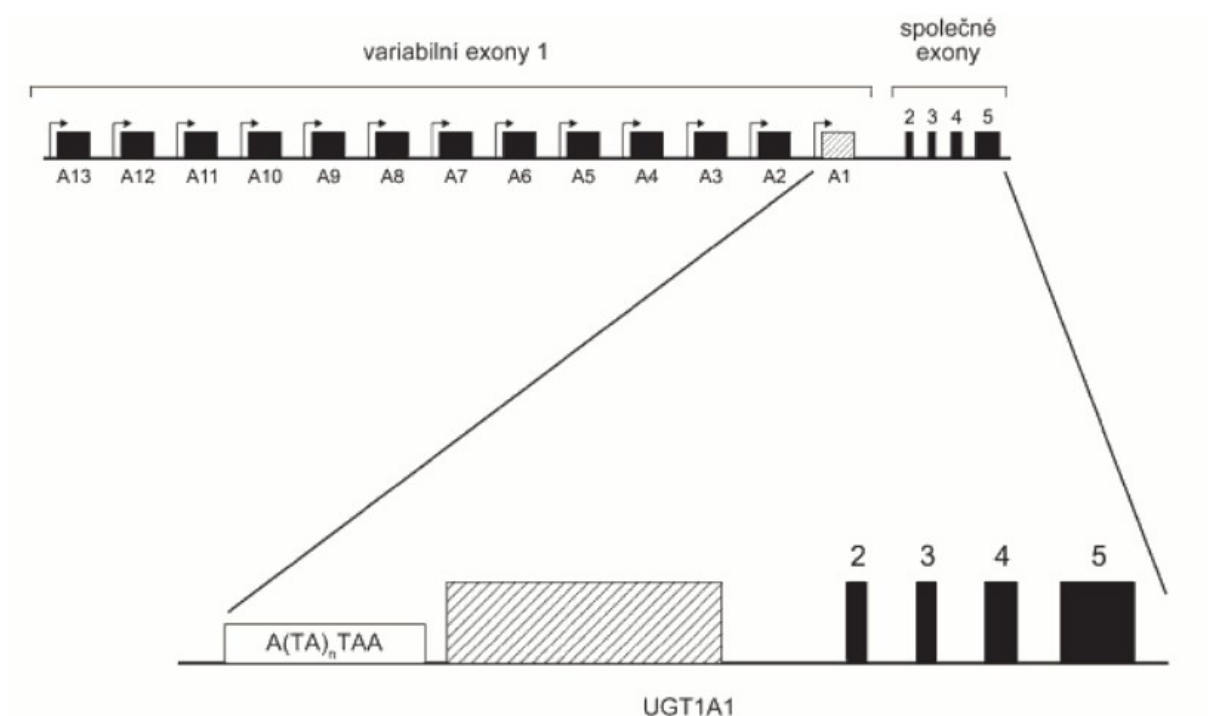
Cimicifuga racemosa (ploštičník hroznatý) se více blíží postavení SERMu. Hlavní účinnou látkou je flavonoid formonetin, dále obsahuje fenolické sloučeniny a deriváty kyseliny hydroxycinamatové. [90]

Většina u nás dostupných přípravků s fytoestrogeny je registrována pouze jako potravinové doplňky. Nemusí tedy prokazovat svou účinnost a bezpečnost pro estrogensenzitivní tkáně, ale pouze zdravotní nezávadnost. Na druhé straně kvalitní přípravky s fytoestrogeny garantují obsah účinné látky, užívají standardizované extrakty a mají k dispozici studie odpovídající zásadám EBM (evidence based medicine). Takovéto fytoestrogenní přípravky mají využitelný terapeutický potenciál v oblasti klimakterické medicíny. [91]

1.7. Role UGT1A1 v metabolismu estrogenů

UGT (UDP-glukuronozyltransferáza) patří do evolučně velmi staré superrodiny enzymů. UGT katalyzují poměrně jednoduchou biochemickou reakci substrátu s kyselinou glukuronovou, jejímž produktem je ve vodě rozpustný konjugát. U člověka bylo identifikováno celkem 16 transkriptů UGT, které byly rozděleny do 2 skupin: UGT1A1 a UGT2 (UGT2 zahrnuje podskupiny UGT2A a UGT2B). UGT2 je lokalizován na dlouhém raménku 4. chromozomu, skládá se ze 6 exonů a její produkty katalyzují glukuronidaci endogenních substrátů včetně steroidních hormonů a žlučových kyselin.

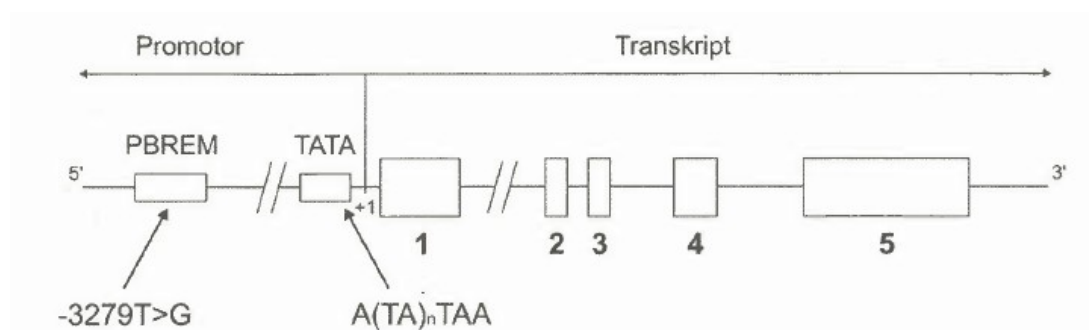
Enzym UGT1A1 je kódován genem lokalizovaným na 2. chromozomu a označovaný jako UGT1. Tento gen kóduje ještě další izoformy glukuronozyltransferáz, zodpovědné za konjugaci kyseliny glukuronové s celou řadou endogenních látek i xenobiotik, jako jsou například fenolické látky, estrogeny, tyroidální hormony nebo opioidy. V závislosti na této variabilitě kóduje tento gen 9 různých izoform glukuronozyltransferázy (UGT1A1-9). Jakákoliv z těchto polymorfních variant může vést k nedostatečné biotransformaci



Obr. 10 Struktura genu *UGT1* (převzato z VÍTEK, L., *Bilirubin a interní choroby*, 2009)

V jaterní tkáni člověka byly identifikovány transkripty *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT1A4*, *UGT1A6* a *UGT1A9*. *UGT1A7* je specifická pro jícen a žaludek, *UGT1A8* pro jícen a tlusté střevo a *UGT1A10* byla nalezena v jícnu, žlučových cestách, žaludku a tlustém střevě. Jedinou transferázou, která katalyzuje glukuronozylaci nekonjugovaného bilirubinu u člověka, je *UGT1A1*. Mutace v genu pro *UGT1A1* s následným snížením aktivity transferázy vedou ke vzniku nekonjugovaných hyperbilirubinemií, které klasifikujeme jako Gilbertův anebo Criglerův-Najjarův syndrom. [92]

Příčina Gilbertova syndromu je částečná deficeience *UGT1A1* a především v euro-americké a africké populaci je specifická sekvenční varianta v TATA boxu promotoru genu *UGT1A1*, kde se nachází vazebné místo pro transkripční faktor IID, důležitý pro iniciaci transkripce celého genu. V lidské populaci byly popsány alelické varianty $A(TA)_{5-8}TAA$, přičemž fyziologická varianta $A(TA)_7TAA$ (*UGT1A1*1*) je spojena s normální aktivitou *UGT1A1*. Vložení TA do sekvence $A(TA)_6TAA$ promotoru za vzniku alely $A(TA)_7TAA$ vede v homozygotním stavu ke vzniku enzymu označovaného též *UGT1A1*28* s 10-33% aktivitou oproti běžné populaci.



Obr.11 Regulace exprese UGT1A1(převzato z VÍTEK, L., Bilirubin a interní choroby, 2009)

Prognóza jedinců s Gilbertovým syndromem je výborná, zvýšené hladiny nekonjugovaného bilirubinu nevedou ke zhoršení kvality života. Komplikace částečné deficience UGT1A1 je vyšší prevalence pigmentových žlučových kamenů a rozvoj závažných nežádoucích účinků léků, které jsou biotransformovány stejným enzymem jako bilirubin. Mezi takovéto léky patří inhibitor topoizomerázy I, irinotecan, který se používá při terapii metastazujícího karcinomu tlustého střeva. Dalším příkladem jsou indinavir, virové proteázové inhibitory používané při léčbě HIV a které jsou metabolizovány prostřednictvím cytochromu CYP4503A4 a částečně i enzymem UGT1A1. Jedním z nežádoucích účinků je vznik nekonjugované hyperbilirubinémie, která je zřejmě způsobena kompeticí těchto léků s UGT1A1. Ethinylestradiol je syntetický estrogen široce používaný jako estrogení komponenta perorální antikoncepce a je také metabolizován enzymem UGT1A1. U žen s Gilbertovým syndromem nebyla shledána zvýšená citlivost k tomuto hormonu, stejně tak jako k endogenním estrogenům, které jsou též biotransformovány enzymem UGT1A1.

Na rozdíl od Gilbertova syndromu je Crieglerův-Najjarův syndrom I. a II. typu charakterizován mutacemi ve strukturální části genu UGT1A1, které vedou k úplnému vymizení (typ I) anebo velmi těžké deficienci (pod 10%, typ II) glukuronozylace bilirubinu. Je tedy podstatně závažnější formou familiární nekonjugované hyperbilirubinémie a většina pacientů I. typu umírá v časném dětském věku na jádrový ikterus. Genetická příčina Criegler-Najjarova syndromu I. typu je nonsense nebo missense mutace v exonech UGT1A1 anebo mutace v intronech UGT1A1, které ovlivňují sestřih mRNA. Zato u II. typu se jedná o missense mutace v exonech UGT1A1. [92]

V jaterní buňce je UGT1A1 lokalizována zejména na hladkém endoplazmatickém retikulu, v menší míře i na membránách hrubého endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a buněčného jádra.

Konjugace bilirubinu je také regulována dostupností UDP-glukuronové kyseliny, která musí být transportována z cytosolu na vnitřní membránu hladkého endoplazmatického retikula, kde je UGT1A1 lokalizována. Relativní nedostatek UDP-glukuronové kyseliny je typický pro novorozenecké období a podílí se na patogenezi novorozenecké žloutenky.

Jak bylo prokázáno nedávno, exprese UGT1A1 je regulována mnoha multifunkčními nukleárními receptory, mezi něž patří konstitutivní androstanový receptor (CAR – constitutive androstane receptor), pregnanový X-receptor (PXR – pregnane X receptor), glukokortikoidní receptor (GR – glucocorticoid receptor) arylový uhlovodíkový receptor (AhR – aryl hydrocarbon receptor) a hepatocytární nukleární faktor 1 α (HNF1 α – hepatocyte nuclear factor 1 α). Všechny tyto faktory stimulují transkripci UGT1A1 přes tzv. fenobarbitalový enhancerový modul (PBREM – fenobarbital-responsive enhancer module), který je výrazně polymorfní. [92]

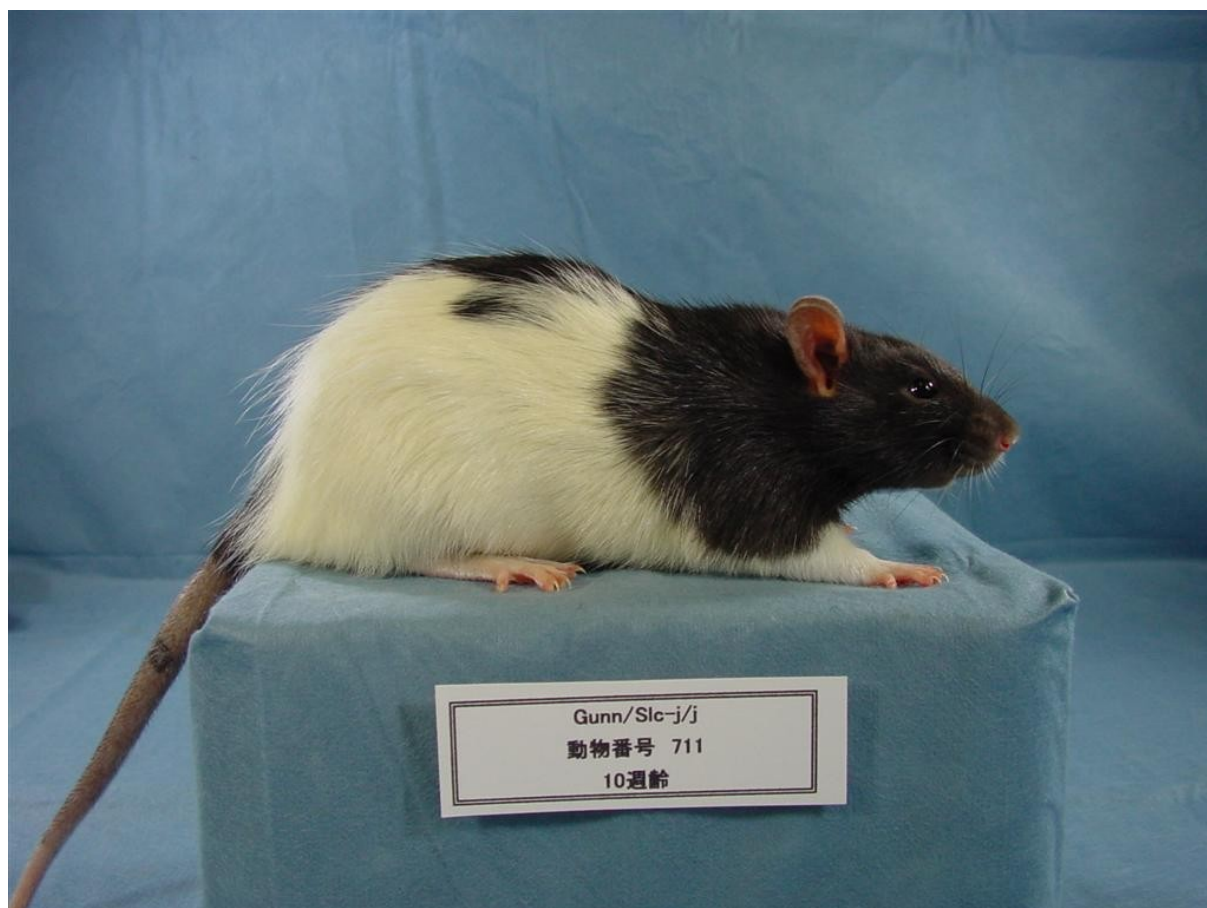
1.8. Potkani kmene Gunn jako model pro studium metabolismu estrogenů

Potkani kmene Gunn slouží jako zvířecí model lidského onemocnění Criegler-Najjarova syndromu I. typu. Kmen se vyznačuje dědičnou chronickou nehemolytickou nekonjugovanou hyperbilirubinémií z důvodu absence jaterní UDP-glukuronozyltransferázové aktivity.

První potkani tohoto kmene byli pozorováni v roce 1938 v Connaughtově laboraři v Torontu a jednalo se o spontánní mutaci v chované Wistar kolonii. Potkani měli acholurickou žloutenku (nadbytek nekonjugovaného bilirubinu). Další studie na tomto kmeni mohly pokračovat až po roce 1957, protože do té doby nebyly známy metody moderní enzymologie a Profesor William E. Castle po celou tuto dobu udržoval kolonii potkanů Gunn při životě. Mutace je způsobená bodovou delecí jedné guanosinové (G) báze v genu UGT1A1 a má autosomálně recesivní charakteristiku. Aktivita UDPGA-dehydrogenázy je srovnatelná s běžnými kmeny zvířat.

Heterozygotní potkani vypadají normálně, bez žloutenky a enzymatický defekt u nich není zřejmě tak výrazný, že by způsoboval retenci bilirubinu v plasmě. Mají relativní nedostatek UDP-glukuronozyltransferázy ale nemají hyperbilirubinémii a

žádné strukturní ani funkční abnormality v ledvinách. Žluč získaná od Gunn potkanů je téměř bezbarvá, postrádá bilirubin glukuronid a obsahuje jen zbytkové množství nekonjugovaného bilirubinu. Homozygotní jedinci produkují žlučový pigment běžnou rychlostí a množství nekonjugovaného bilirubinu v séru a v tkáních je u nich relativně konstantní, přestože jejich játra nejsou schopná bilirubin konjugovat. [93]



Obr. 12 Potkan kmene Gunn (převzato z http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strains/Strains_d.aspx?StrainID=370)



Obr. 13 Orgány potkana kmene Gunn (převzato z http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strains/Strains_d.aspx?StrainID=370)

2. METODIKA

2.1. Zvířecí experiment

V experimentu bylo využito celkem 14 dospělých samic laboratorních potkanů kmene Gunn a 10 odpovídajících heterozygotů. Odběry byly provedeny ve dvou etapách. V první skupině bylo celkem 11 kontrolních samic (HK a GK), ve druhé 13 samic (NC, NE, GC, GE). Experimentální zvířata byla rozdělena do 4 skupin. Kontrolní heterozygoti (Het Ctrl), heterozygoti s aplikací účinné látky (Het EE), kontrolní homozygoti Gunn (Gunn Ctrl) a homozygoti Gunn s aplikací účinné látky (Gunn EE).

Označení potkanů pracovními názvy dle rozdělení do skupin je následující:

Het Ctrl	Het EE	Gunn Ctrl	Gunn EE
NC1	NE1	GK1	GE1
NC2	NE2	GK2	GE2
HK2	NE3	GK3	GE3
HK3		GK4	GE4
HK4		GK5	GE5
HK5		GK6	
HK6		GC1	
		GC2	
		GC3	

Experimentálním skupinám byla subkutánně aplikována injekce ethinylestradiolu (5mg/kg váhy) rozpuštěného v propandiolu, kontrolním zvířatům byl aplikován pouze propandiol (100 μ l na 100 g váhy) po dobu 5-ti dní. 6. den byl potkan uspán a pod narkózou byla odebrána krev (plná 50 μ l do EDTA), krev srážlivá na sérum- pro základní biochemii a žlučové kyseliny, játra, ledviny, děloha, ovaria. Játra byla promyta fyziologickým roztokem, část orgánů byla dána do stabilizačního roztoku pro uchování RNA (RNA Later) a skladována při -80°C.

2.2. Biochemické metody

Použité přístroje

- automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi
- spektrofotometr Spekol 11
- nastavitelné pipety 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1ml
- plastové zkumavky
- krátké skleněné zkumavky
- RNase-prosté mikrozkušavky rotor-stator homogenizátor
- spektrofotometr NanoDrop ND-1000
- vortex
- centrifuga
- analytické váhy

- elektroforéza
- termocycler
- real-time PCR
- laminární box
- mrazící box -80°C
- RNA izolační kolonky
- UV transluminátor se záznamovým zařízením

Použité chemikálie

- R1: Tris pufr, pH 7,50, L-alanin, LD $\geq 75 \mu\text{kat/l}$
- R2: 2-oxoglutarát, NADH
- R1: Tris pufr, pH 7,8, L-aspartát, LDH $\geq 12,5 \mu\text{kat/l}$, MDH $\geq 12,5 \mu\text{kat/l}$
- R2: 2-oxoglutarát, NADH 0,9 mmol/l
- 2-amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,4 (30 °C)
- Octan hořečnatý
- Síran zinečnatý
- HEDTA
- 4-nitrofenylfosfát
- R1: $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (pufr octanu sodného), $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ (kys. sulfamová)
- R2: HCl, diazoniové soli
- R1: glycinový pufr
- R2: latexová suspenze 0,20 % roztok latexových částic pokrytých králíčími protilátkami proti lidskému CRP
- R1: hydroxid sodný, vinan sodno-draselný
- R2: hydroxid sodný, vinan sodno-draselný, jodid draselný, síran měďnatý
- Bile acids Reagent A
- Bile acids Reagent B
- Bile acids Control set
- Bile acids calibrator (200, 100, 50, 25, a $5 \mu\text{mol/l}$)
- Bile acids Stop Reagent
- Total RNA Purification Kit (Norgen)
- RNAlater

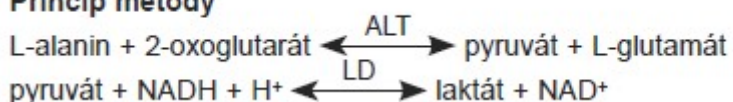
- 70% etanol
- RNA free voda
- barva GEL RED
- TBE pufr
- Prášková agaróza
- Bromfenol blue
- High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems)
- TaqMan Master Mix
- Sterilní voda
- prim/prob mixture β globin
- prim/prob mixture CYP
- prim/prob mixture UGT
- prim/prob mixture SULT

2.2.1. Stanovení aktivity aminotransferáz ALT a AST

2.2.1.1. ALT

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi a souprava ke stanovení katalytické koncentrace alaninaminotrasferázy (ALT) v séru nebo v plasmě, modifikace metody IFCC.

Princip metody



Činidla

R1 Pufr 4x50 ml

Tris pufr, pH 7,50 125 mmol/l

L-alanin 625 mmol/l

LD \geq 75 μ kat/l

R2 Startér 1x50 ml

2-oxoglutarát 75 mmol/l

NADH 0,9 mmol/l

Složení reakční směsi

Tris pufr (pH 7,5) 100 mmol/l

L-alanin 500 mmol/l

LD \geq 20 μ kat/l

2-oxoglutarát 15 mmol/l

NADH 0,18 mmol/l

Dle IFCC doporučení se přidává k pufru (činidlo 1) PDP (pyridoxal-5'-fosfát). Koncentrace PDP v reakční směsi je 0,1 mmol/l. K danému objemu činidla 1 se přidává odpovídající počet tablet PDP: 1 lahvička činidla = 1 tableta PDP.

Činidlo R1 (pufr)	1,000 ml
Vzorek	0,100 ml

Promíchá se a inkubuje 5 minut při 37 °C a přidá se:

Činidlo R2 (substrát)	0,250 ml
-----------------------	----------

Promíchá se a měří se absorbance v 1 minutových intervalech po dobu nejméně 3 minut. Vypočítá se průměrná změna absorbance za 1 minutu (ΔA).

Výpočet

$$1. \text{ ALT } (\mu\text{kat/l}) = C_{\text{kal}} \times \frac{\Delta A_{\text{vz}}}{\Delta A_{\text{kal}}}$$

C_{kal} = koncentrace kalibrátoru

2.2.1.2. AST

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi a souprava ke stanovení katalytické koncentrace AST v séru nebo v plasmě, modifikace metody IFCC.

Princip metody



Činidla

R1 Pufr 4x50 ml

Tris pufr, pH 7,8 100 mmol/l

L-aspartát 300 mmol/l

LDH \geq 12,5 $\mu\text{kat/l}$

MDH \geq 12,5 $\mu\text{kat/l}$

R2 Startér 1x50 ml

2-oxoglutarát 60 mmol/l

NADH 0,9 mmol/l

Složení směsi R1+R2

Tris pufr (pH 7,8) 80 mmol/l

L-aspartát 240 mmol/l
 LDH $\geq 10 \mu\text{kat/l}$
 MDH $\geq 10 \mu\text{kat/l}$
 2-oxoglutarát 12 mmol/l
 NADH 0,18 mmol/l

Dle IFCC doporučení se přidává k pufru (činidlo 1) PDP. Koncentrace PDP v reakční směsi je 0,1 mmol/l. K danému objemu činidla 1 se přidává odpovídající počet tablet PDP: 1 lahvička činidla = 1 tableta PDP.

Dvoureagenční metoda – start substrátem

Činidlo R1 (pufr)	1,000 ml
Vzorek	0,100 ml

Promíchá se a inkubuje 5 minut při 37 °C a přidá se:

Činidlo R2 (substrát)	0,250 ml
-----------------------	----------

Promíchá se a měří se absorbance v 1 minutových intervalech po dobu nejméně 2 minut. Vypočítá se průměrná změna absorbance za 1 minutu (ΔA).

Výpočet

$$1. \text{ AST } (\mu\text{kat/l}) = C_{\text{kál}} \times \frac{\Delta A_{\text{vz}}}{\Delta A_{\text{kál}}}$$

$C_{\text{kál}}$ = koncentrace kalibrátoru

2.2.2 Stanovení alkalické fosfatázy ALP

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi. Míru katalytické koncentrace enzymu je množství uvolněného 4-nitrofenolu, který se stanovuje fotometricky kinetickým postupem v séru a v plazmě.

R1 Pufr 4 x 100 ml

2-amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,4
 (30 °C) 434 mmol/l

Síran zinečnatý 1,24 mmol/l

HEDTA 2,48 mmol/l

Octan hořečnatý 2,48 mmol/l

R2 Substrát 1x100 ml

4-nitrofenylfosfát 81,6 mmol/l

Složení reakční směsi

2-amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,4 (30 °C) 350 mmol/l

Octan hořečnatý 2 mmol/l

Síran zinečnatý 1 mmol/l
 HEDTA 2 mmol/l
 4-nitrofenylfosfát 16 mmol/l

Použitá byla dvoureagenční metoda start substrátem.

	Reagenční blank	Kalibrátor	Vzorek
Činidlo R1	0,800 ml	0,800 ml	0,800 ml
Vzorek	–	–	0,020 ml
Kalibrátor	–	0,020 ml	–
Destilovaná voda	0,020 ml	–	–
Promíchá se, preinkubuje se 5 minut při 37 °C a pak se přidá			
Činidlo R2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml

Promíchá se, inkubuje se 1 minutu při 37 °C a měří se absorbance vzorku a kalibrátoru proti reagenčnímu blanku v jednominutových intervalech po dobu 3 minut. Vypočte se průměrná změna absorbance za 1 minutu ($\Delta A/\text{min}$).

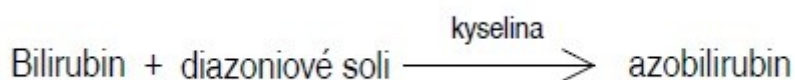
Výpočet

$$\text{Alkalická fosfatasa } (\mu\text{kat/l}) = \frac{\Delta A_{\text{vz}}/\text{min}}{\Delta A_{\text{kal}}/\text{min}} \times C_{\text{kal}}$$

C_{kal} = koncentrace kalibrátoru

2.2.3 Stanovení celkového bilirubin

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi. Celkový bilirubin v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla kopuluje diazoniovými ionty v kyselém prostředí.



Intenzita zabarvení vytvářeného azobilirubinu je přímo úměrná koncentraci celkového bilirubinu a může být změřena fotometricky. Analyzátor automaticky vypočítá koncentraci analytu pro každý vzorek. Převodní faktor: $\text{mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L}$

Reagencie - pracovní roztoky:

R1 C₂H₃NaO₂ (pufr octanu sodného): 85 mmol/L; H₃NO₃S

(kys. sulfamová): 110 mmol/L; detergent; rozpouštědlo

R2 HCl: 100 mmol/L; diazoniové soli: 3 mmol/L

2.2.4. Stanovení CRP

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi. Vysoce citlivá souprava je určena ke kvantitativnímu stanovení CRP v séru imunoturbidimetrickou metodou. Latexové částice jsou pokryty protilátkami specifickými pro lidskému C-reaktivnímu proteinu. Reagují s CRP přítomným v séru pacienta za vzniku imunokomplexů. Ty způsobují zvýšení rozptylu světla, který je úměrný koncentraci CRP v séru (imunoturbidimetrie). Míra rozptylu světla se měří odečtením absorbance při 570 nm. Koncentrace CRP je určována z kalibrační křivky. CRP 3 reagencie je kalibrována jednou ze tří kalibračních souprav. Každý kalibrátor umožňuje měření CRP při různých lineárních rozsazích.

Reagencie (v kapalném stavu)

R1: Pufr,

170 mM glycinový pufr 1 x 50 ml

R2: Latexová suspenze 1 x 50 ml 0,20 % roztok latexových částic
pokrytých králičími protilátkami proti lidskému CRP

Postup měření

Vzorek 3 μ L

↓

• ← R1 (Pufr), 150 μ L

↓ 37°C, 5 minut

• ← R2 (latex.suspenze) 150 μ L

↓ 37°C, 5 minut

Provede se dvoubodové konečné měření při 800/570 nm. Koncentraci CRP určí přístroj pomocí kalibrační křivky.

2.2.5. Stanovení celkové bílkoviny

Použit byl automatický laboratorní analyzátor MODULAR firmy Roche/Hitachi. Principem testu je kolorimetrické stanovení. Připraví se vzorek a přidá se R1 a poté přidání R2 a zahájení reakce. Dvojmocná měď reaguje v alkalickém prostředí s peptidickými vazbami proteinů za vzniku purpurově zbarveného biuretového komplexu. Vinan sodno-draselný zabraňuje precipitaci hydroxidu měďnatého a jodidu draselného, bránícího autoredukci mědi.



Intenzita vytvářeného zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu a může být stanovena fotometricky. Analyzátor automaticky vypočítá koncentraci analytu pro každý vzorek.

Převodní faktor: $\text{g/dL} \times 10 = \text{g/L}$

Reagencie - pracovní roztoky:

R1 Hydroxid sodný: 400 mmol/L; vinan sodno-draselný: 89 mmol/L

R2 Hydroxid sodný: 400 mmol/L; vinan sodno-draselný: 89 mmol/L; jodid draselný: 61 mmol/L; síran měďnatý: 24,3 mmol/L

2.3. Stanovení celkových žlučových kyselin

Žlučové kyseliny, hlavně cholová, chenodeoxycholová, deoxycholová a litholová, jsou oxidovány na 3-oxokyseliny za katalýzy 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázy. Při této oxidační reakci je nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) redukován na NADH. Vzniklý NADH je v dalším kroku oxidován NBT na NAD. Reakce je katalyzována diaphorázou. Produkt této reakce, formazan, je měřen při 530 nm. Intenzita zabarvení formazanu je přímo úměrná množství žlučových kyselin v séru.

Typ primárního vzorku a druh odběrových nádobek:

Stanovení se provádí ze vzorku srážlivé krve (zlatý Vacutainer). Krev je nutné stočit na centrifuze při otáčkách 3000/min. Sérum se nepipetuje a uchovává při -20°C. Vzorek je stabilní 2 týdny při 4-8°C a 6 měsíců při -20°C.

Přístroje a pomůcky

Spekol 11

Nastavitelné pipety 200 μ l, 1ml

Plastové 50, 15 ml zkumavky

Krátké skleněné zkumavky

Činidla, chemikálie a další materiály

- Bile acids Reagent A
- Bile acids Reagent B
- Bile acids Control set (hladiny norma a abnormal) => skladovány při 2-8°C, před stanovením vytemperovat na laboratorní teplotu
- Bile acids calibrator (200, 100, 50, 25, a 5 μ mol/l) => skladovány při 2-8°C před stanovením vytemperovat na laboratorní teplotu
- Bile acids Stop Reagent => skladován při 18-26°C
- Fyziologické vzorky

Pracovní postup

200µl vzorku, kalibrátorů a kontrol se napipetuje do blankových i vzorkových skleněných zkumavek. Nejprve je třeba přidat do blankových zkumavek 500µl vytemperovaného Blank reagentu (viz. tab) a promíchat. Následně probíhá reakce 5 min. při 37°C. Po proběhnutí reakce se přidá 100µl Stop Reagent ve stejných intervalech jako byl pipetován Blank Reagent, promíchá se a nechá se stát 5 minut při laboratorní teplotě. Zabarvení reakce je stabilní 1 hodinu. Další krokem je měření, které probíhá v mikrokyvetách ve spektrofotometru Spekolu 11 při vlnové délce 530 nm, blankem je voda. Do vzorkových zkumavek se přidá vytemperovaný Test Reagent (viz. tab) a promíchá se. Opět probíhá reakce 5 min při 37°C. Po proběhnutí reakce se přidá 100µl Stop Reagentu ve stejných intervalech jako byl pipetován Blank Reagent, ihned se promíchá a nechá se stát 5 minut při laboratorní teplotě. Zabarvení reakce je stabilní 1 hodinu. Měření probíhá v mikrokyvetách na Spekolu 11 při vlnové délce 530 nm, blank je voda.

Příprava test a blank reagentu

	Test Reagent	Blank Reagent
příprava	4 ml Bile acids Reagent A	4 ml Bile acids Reagent A
	1 ml Bile acids Reagent B	1 ml dionizované vody

	Testovací kit Bile Acids fi. Trinity Biotech	
	Bile acids Reagent A	Bile acids Reagent B
výpočet	$V_{an} = 0,8 \text{ ml} \times n \text{ vzorků} / 1$ vzorek	$V_{BN} = 0,1 \text{ ml} \times n \text{ vzorků} / 1$ vzorek
	$m_{an} = V_{an} \times m_{ca} / 100 \text{ ml}$	$m_{BN} = V_{BN} \times m_{CB} / 25 \text{ ml}$

Zkratky:

V_{AN} = objem reagentu A na n vzorků

V_{BN} = objem reagentu B na n vzorků

m_{AN} = množství Reagentu A na n vzorků

m_{BN} = množství Reagentu B na n vzorků

m_{CA} = celkové množství Reagentu A

m_{CB} = celkové množství Reagentu B

Biologické referenční rozmezí

0 – 8 µmol/l

Dokumentace, zpracování dat a vydání výsledků

Změřené hodnoty absorbancí blanků vzorků (kalibrátorů, kontrol) odečteme od hodnot absorbancí vzorků (kalibrátorů, kontrol). Z kalibrační závislosti absorbance kalibrátorů na jejich koncentraci získáme rovnici přímky, z které pomocí excelu vypočítáme koncentraci žlučových kyselin v séru v $\mu\text{mol} / \text{l}$. Závislost je lineární do $200 \mu\text{mol} / \text{l}$. Je-li koncentrace nad $200 \mu\text{mol/l}$, je nutné vzorek ředit fyziologickým roztokem. Vzorky s výsledkem $20 \mu\text{mol} / \text{l}$ a více se uchovávají při -20°C na stanovení frakcí žlučových kyselin.

2.4. Molekulárně biologické metody

2.4.1. Izolace RNA

Při izolaci RNA je třeba postupovat tak, aby nedošlo k degradaci RNA všudypřítomnými RNázami, které jsou odolné vůči teplotě, detergentům a nevyžadují pro svou aktivitu žádné kofaktory. Hlavním zdrojem RNáz je především náš izolovaný vzorek. Ve vzorku lze předejít degradaci RNA použitím nízké teploty (-80°C) a stabilizačního roztoku RNA Later během zpracování vzorku před umístěním do lyzačního pufru. Lyzační pufrý jsou většinou složeny z chaotropních činidel (guanidium chlorid, guanidium thiokyanát), které RNázy inaktivují. Po odstranění těchto pufrů hrozí další nebezpečí degradace RNA. Jde o fázi precipitace RNA ethanolem. Po precipitaci je RNA peleta rozpuštěna ve vhodném pufru nebo deionizované vodě a tyto musí být RNáz prosté, jinak bychom si mohli degradovat finální produkt a znehodnotit celý izolační postup. Během další manipulace s izolovanou RNA je nezbytné zamezit případné kontaminaci vzorku RNázami. Eventuálními zdroji mohou být naše ruce anebo bakteriální kontaminace roztoků a laboratorního materiálu. Ošetření laboratorního materiálu umožňujícího degradovat RNázy spočívá v žíhání skleněných pomůcek za vysoké teploty (180°C 8 hod), nebo ošetření pomůcek chloroformem. Odstranění RNáz z vody je možné přidáním diethylpyrokarbonátu, jež inkubujeme přes noc a posléze degradujeme autoklávováním. Povrchy laboratorních přístrojů a pracovních ploch je možné ošetřit speciálními detergenty ničící RNázy. Samozřejmostí je používání ochranných rukavic, dodržování čistoty, minimalizace času při zpracování vzorku a hlavně využívání jednorázového plastu, který je certifikován jako RNáz prostý. [94]

Pracovní postup

Izolaci RNA jsme provedli pomocí kitu Total RNA Purification Kit (Norgen). Nejprve jsme si připravili lyzační roztok a to tak, že jsme přidali β -ME (merkaptoethanol) redukčního činidla do lyzačního roztoku a to v množství 10 μ L β -ME na 1 mL lyzačního roztoku (namíchali jsme pouze takové množství, které se spotřebuje, protože stabilita roztoku je maximálně 30 dní od namixování). Poté jsme si připravili promývací roztok z 50 mL 95%ního etanolu do lahvičky poskytnuté výrobcem kitu, celkový objem roztoku byl 72 mL.

Dalším krokem byla příprava vzorku, navázali jsme 10 mg jater (čerstvé nebo uchovávané v RNA Later) a to tak, aniž by se vzorek rozmrazil. Po navázání jsme ihned přidali lyzační pufr (hotový) do RNáze-prostých 2mL mikrozkušavek, které byly 2x autoklávované.

Abychom provedli homogenizaci a buněčnou lýzu, tak je třeba použít na 10 mg vzorku 600 μ L lyzačního pufru. Rotor-stator homogenizaci jsme prováděli po přidání lyzačního pufru ke vzorku a na nižší otáčky jsme homogenizovali do zmizení viditelných částic vzorku. V homogenizaci jsme ještě pokračovali cca 1 minutu na nejvyšší otáčky. Přidali jsme 70% etanol ve stejné dávce jaké byl objem vzorku (tj. na 100 μ L lyzátu se přidalo 100 μ L etanolu, pipetuje se tedy 600 μ L etanolu) a slabě jsme promíchali.

Dalším krokem bylo navázání RNA na kolonku. Nasadili jsme kolonku na sběrnou epinku a napipetovali 600 μ L lyzátu s etanolem. Centrifugovali jsme při 14 000xG po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Pokud se stalo, že neprošel celý lyzáat, tak jsme ještě centrifugovali další minutu navíc. Odpad který prošel skrze kolonku bylo potřeba vylít.

K promytí kolonky bylo použito 400 μ L promývacího roztoku, který se pipetoval na kolonku a poté jsme kolonku 1 minutu centrifugovali při 14 000xG. Bylo třeba odstranit vše, co prošlo skrze kolonku a celý promývací krok jsme zopakovali ještě dvakrát. Po posledním promytí jsme odstranili vše, co prošlo skze kolonku a samotnou kolonku jsme centrifugovali ještě další 2 minuty při 14 000xG, aby jsme odstranili veškerý promývací roztok. Sběrnou mikrozkušavku jsme vyhodili.

Posledním krokem byla eluce RNA. Opatrně jsme přesunuli purifikační kolonku do nové zkumavky tak, aby nepřišla do kontaktu s odpadem ve sběrné mikrozkušavce. K eluci se použila eluční mikrozkušavka o objemu 1,7 mL, která byla součástí kitu. Následně bylo přidáno 50 μ L elučního roztoku na purifikační

kolonku k eluci RNA, celá plocha v kolonce musela být pokryta elučním roztokem. Nejprve jsme centrifugovali 2 minuty při 200xG a poté další minutu při 14 000xG, dokud neprošel veškerý eluční roztok skrze kolonku. Pro jistotu jsme centrifugovali kolonku další minutu při 14 000xG. Purifikační kolonka se vyhodila, vzorky se řádně popsaly a RNA jsme ihned uložili na led a skladovali při -80°C. Kvůli rozmrazování se vzorky ukládají jako 3 alikvoty po 10µL.

2.4.2. Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA je stanovena měřením absorbance na spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Kontrola čistoty RNA může být stanovena jako poměr mezi hodnotami absorbance při 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) s ohledem na kontaminanty absorbující v UV, např. proteiny a fenoly. Nicméně A_{260}/A_{280} poměr je výrazně ovlivněn pH. Nižší pH dává nižší A_{260}/A_{280} poměr a menší senzitivitu k případné kontaminaci proteiny. Obě dvě stanovení se kalibrovala na vodu. Pro přesnější ověření kvality RNA je třeba dále provést elektroforézu na agarovém gelu.

2.4.3. Analýza RNA gelovou elektroforézou

Celistvost RNA a její kontaminace DNA jsou kontrolovány elektroforeticky. Fragmenty DNA a RNA se dělí podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje elektroforézou fragmentů v gelu. Ke třídění molekul RNA a DNA se používá nejčastěji agarózový gel, pro menší molekuly pak také polyakrylamidový gel. Agarózový gel se připravuje vylitím roztoku agarózy do připravené formy s hřebínkem. Po ochlazení a gelifikaci agarózy je hřebínek vyjmut z gelu a gel vyjmut z formičky, takže zůstává plátek gelu s jamkami po vyjmutém hřebínku. Tento gel je umístěn do elektroforetické vany a zalit elektroforetickým pufrem. Vzorky DNA je pak potřeba vpravit do jamek v gelu, které jsou již v této chvíli pod hladinou pufru. Pro vpravení je proto potřeba použít zvláštní techniku tzv. nanášení na gel. Pak je možné uzavřít elektrický okruh připojením ke stabilizovanému zdroji napětí - od té chvíle probíhá elektroforéza a molekuly se pohybují rozdílnou rychlostí podle své velikosti.

Elektroforézu je nutné vypnout v okamžiku, kdy jsou molekuly přiměřeně roztříděny. Pokud by elektrické pole působilo příliš dlouho, molekuly by z gelu vycestovaly až ke kladně nabitě elektrodě, kde by došlo k jejich degradaci. Protože

ale nukleové kyseliny nemůžeme během elektroforézy v gelu vidět, používáme barvivo. Pokud gel položíme na UV-transluminátor, který je plochým zdrojem UV-záření, molekuly RNA a DNA v gelu září. Elektroforéza musí probíhat ve vodném roztoku o stálém pH, proto jsou pro přípravu gelu a naplnění elektroforetické vany používány pufrы. Jejich úkolem je především neutralizovat ionty H^+ a OH^- , které vznikají hydrolýzou vody na elektrodách. Hustotu gelu je nutné také přizpůsobit velikosti molekul, které chceme třídít. Pokud chceme dobře roztrdit velké molekuly, musíme připravit řidší síť s většími oky. Pokud by byla síť příliš hustá, velké molekuly by se gelem prodíraly velmi pomalu a rozdíly v rychlosti pohybu mezi molekulami by byly malé. Opak platí pro malé molekuly, pro které je potřeba použít buď speciální husté druhy agarózy nebo polyakrylamidový gel. Pokud by byl gel příliš řidký, malé molekuly by procházely snadno a rychle a opět by nebyly velké rozdíly v pohyblivosti různých molekul, třídění by nebylo účinné. Aby se rozdíly v pohyblivosti molekul v gelu staly patrnými, musí elektroforéza působit dostatečnou dobu, resp. molekuly musí urazit dostatečnou dráhu na své cestě gelem. Protože jsou molekuly během elektroforézy stále v pohybu, záleží poloha konkrétní molekuly v gelu na síle použitého elektrického pole a době putování gelem (= tj. na okamžiku kdy vypneme příkon elektrické energie). Pokud předem neznáme velikost molekul, které třídíme, můžeme ji proto zjistit pouze srovnáním s velikostí známých molekul, které budou vystaveny stejným podmínkám třídění. Proto se při gelové elektroforéze používají markery molekulové hmotnosti.

Pokud jsou molekuly správně roztrdény, pak každý pruh zářící po obarvení fluorescenčním barvivem v UV-světle představuje určité množství určité molekuly dané délky.

Příprava 1 – 2 % agarózového gelu

Vaničku potřebné velikosti je potřeba oblépit izolační páskou, aby dobře těsnila a zkontrolovat, zda je ve vyvážené poloze, podle potřeby dorovnáme malou vodováhou. Do vaničky se vloží hřebínek a naváží se agaróza (pro střední vanu 1 gram agarózy na 100 mL gelu). Naváženou agarózu (1%) je třeba rozpustit v 0,5 x TBE pufru. Ohřívání jsme v mikrovlnné troubě cca 3 minuty, v průběhu jsme ohřev přerušovali, aby nedošlo k přetečení kádinky vlivem vybublávání gelu. 1 minutu se nechá gel chladnout, poté jsme přidali 10 μ L barvy GEL RED (10 000krát

koncentrovaná) do 100 mL gelu. Gel jsme opatrně nalili do vaničky a nechali 30 minut tuhnout. Po zatuhnutí a vyjmutí hřebínku byl gel vložen do lázně elektroforetického přístroje, gel jsme zalili 0,5x TBE pufrem.

Nanášení na gel

Na agarózový gel se obvykle nanáší 0,5 – 2 µg RNA. Napipetovali jsme potřebné množství RNA a přidali ke všem vzorkům 1 µL Bromfenol blue. Doplnili jsme do objemu 10 µL RNA-prostou vodu a krátce jsme stočili na stolní centrifuze. Nanesli jsme do každé jamky 10 µL roztoku, bylo třeba si dávat pozor na opatrnou manipulaci se špičkou, při nevhodné manipulaci hrozilo protržení jamky, anebo spojení dvou vedlejších jamek. Zapnuli jsme elektroforetický přístroj a nechali běžet přibližně 1 hodinu při napětí $U = 120V$. Výsledek elektroforézy a čistoty RNA jsme zkontrolovali pod UV světlem a vyfotili pro archivaci a pozdější kontroly.

2.4.4. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém je přepisována genetická informace z RNA do deoxyribonukleové DNA. V podstatě jde o obrácený postup, než jaký probíhá v naprosté většině případů přenosu genetické informace – při transkripci, kdy se genetická informace přepisuje z DNA do RNA. Při reverzní transkripci dochází k úpravě genetické informace a napadená buňka a její potomci provádějí jinou činnost, než je její obvyklá – např. produkci toxinů nebo přímo virů, které buňku původně napadly. Schopnost používat reverzní transkripci mají v přírodě retroviry (podskupina RNA virů), u kterých se proces podporován enzymem reverzní transkriptázou. Reverzní transkriptáza je enzym, který se účastní syntézy DNA, a proto patří mezi DNA polymerázy. Enzym reverzní transkriptázu si osvojily zejména různé viry. Na druhou stranu i lidská telomeráza je ve své podstatě reverzní transkriptáza. Pro transkripci in vitro se používá jako primer oligo dT nebo jiný hexamer, popřípadě genově specifický primer

Metodika

Pro práci jsme použili kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix od firmy Applied Biosystems. Při této metodě se používá RNase-prostý materiál. Potřebné

komponenty z kitu se nechali roztát na ledu. Roztok se připravil v objemu 20 μL a počítalo se ještě s rezervou na 2 vzorky. Do jednotlivých zkumavek jsme rozpipetovali 4 μL Master Mixu a 13 μL RNase-prosté vody. Do roztoku se přidaly 3 μL RNA daného vzorku.

Dobře jsme zavřeli zkumavky a rychle jsme zkumavku stočili pro sběr tekutin na stěnách a odstranění vzduchových bublin. Následně jsme ji umístili do termocycleru a spustili program optimalizovaný na použitý kit.

Program:

Krok 1	teplota 25°C	5 minut
Krok 2	teplota 42°C	30 minut
Krok 3	teplota 85°C	5 minut
Krok 4	teplota 4°C	∞

cDNA se uchovává v mrazáku v -20°C do dalšího použití.

2.4.5. Real – time PCR (qPCR)

Real-time PCR je molekulární metoda založená na principu klasické PCR (polymerázové řetězové reakce). Při klasické PCR je amplifikovaný produkt detekován po proběhnutí reakce pomocí gelové elektroforézy. Při real-time PCR je produkt detekován a měřen po každém cyklu, což umožňuje detekci produktu a zároveň kvantifikaci výchozího množství templátu. Odpadá potřeba gelové elektroforézy, čímž se zkracuje čas potřebný pro získání výsledků. Detekce PCR produktu v průběhu reakce je umožněna přidáním fluorescenční barvy do reakční směsi. Zvýšení množství PCR produktu se odrazí ve zvýšení fluorescence.

Speciální cycler, ve kterém reakce probíhá, měří fluorescenci po každém cyklu a zaznamenává údaje. Tyto údaje jsou posléze softwarem vyneseny do grafu, kde na ose x leží jednotlivé cykly (např. 1-35) a na ose y je vynesena fluorescence. Křivka amplifikační reakce má dvě fáze: exponenciální, ve které se množství PCR produktu zdvojnásobí v každém cyklu a neexponenciální plateau fázi, kde došlo k vyčerpání některé z komponent reakce. Na počátku reakce je fluorescence nízká a nedetekovatelná. S průběhem reakce se postupně hromadí množství PCR produktu, čímž narůstá i fluorescence. Cyklus, ve kterém se nahromadilo tolik PCR produktu,

že fluorescence byla detekována, se nazývá threshold cycle (Ct). Hodnoty Ct jsou různé pro jednotlivé vzorky a závisí na počátečním množství templátu. Větší množství templátu znamená, že méně cyklů stačí na dostatečný (detekovatelný) nárůst fluorescence. Takový vzorek má nižší Ct. Hodnota Ct je stanovena v exponenciální části, kdy žádná z reakčních komponent není limitující.

Existují dva základní typy chemických přístupů využívaných v real-time PCR: přidání nespecifických interkalačních fluorescenčních látek (SYBR Green I, YO-PRO-1, etidium bromid) do reakční směsi nebo použití značených sekvenčně specifických primerů a prób (TaqMan, molecular beacons, scorpions primer). Já jsem při své práci použila technologii, která využívá značenou próbu je TaqMan. TaqMan kromě sekvenčně specifických primerů vyžaduje přítomnost sekvenčně specifické TaqMan próby, která na svém 5' konci nese fluorescenční reportérovou molekulu a na 3' konci zhášecí fluorescence. Intaktní próba nevykazuje žádnou fluorescenci díky blízkosti reportéru a zhášecí. Při annealingu hybridizuje próba na cílovou sekvenci ve směru extenze nového řetězce. 5'-3' exonukleázová aktivita DNA polymerázy odštěpí při extenzi primeru reportérovou molekulu (ta se uvolní z blízkosti zhášecí) a dojde k uvolnění fluorescence, která je detekována.

Při hodnocení je možné použít absolutní nebo relativní kvantifikaci templátové DNA. Relativní kvantifikace zaznamenává změny v expresi genů (v množství templátu) mezi vzorky a vyjadřuje je v poměru k množství jiné DNA, která slouží jako standard neboli referenční gen. Kvantifikace je tedy relativní – udává množství templátu vzhledem k množství templátů jiného vzorku. Pro relativní i absolutní kvantifikaci je vyvinuto několik matematických postupů zpracování dat. [95]

Metodika

Nejdříve jsme naředili veškerou cDNA, kterou jsme plánovali používat a to v poměru 10 µL cDNA ku 40 µL sterilní vody. Po celou dobu se pracovalo v laminárním boxu. Používali jsme speciální 96-ti jamkové destičky, do kterých jsme pipetovali celkem 20 µL roztoku. Jako referenční (house keeping) gen jsme použili β globin a objednané geny ke zkoumání byly tyto: CYP1A2, UGT1A1 a SULT1A1. Pro každý gen i referenční jsme připravili roztok o složení:

TaqMan Master Mix	328 µL
voda	22 µL

prim/prob mixture β globin, nebo CYP, nebo UGT, nebo SULT 33 μ L

Roztok jsme promíchali, v průběhu práce bylo třeba roztok opakovaně promíchávat, aby nedošlo k usazování těžších částic u dna. Rozpipetovali jsme roztok dle rozklesleného plánu a to v množství 15 μ L do každé jamky. Poté jsme přidávali 5 μ L cDNA v dubletech.

1. destička:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC1	GC1	GC2	GC2	GC3	GC3	GE2	GE2	GE1	GE1	GE3	GE3
B	GE4	GE4	GE5	GE5	NC1	NC1	NC2	NC2	GK1	GK1	GK2	GK2
C	GC1	GC1	GC2	GC2	GC3	GC3	GE2	GE2	GE1	GE1	GE3	GE3
D	GE4	GE4	GE5	GE5	NC1	NC1	NC2	NC2	GK1	GK1	GK2	GK2
E	GC1	GC1	GC2	GC2	GC3	GC3	GE2	GE2	GE1	GE1	GE3	GE3
F	GE4	GE4	GE5	GE5	NC1	NC1	NC2	NC2	GK1	GK1	GK2	GK2
G	GC1	GC1	GC2	GC2	GC3	GC3	GE2	GE2	GE1	GE1	GE3	GE3
H	GE4	GE4	GE5	GE5	NC1	NC1	NC2	NC2	GK1	GK1	GK2	GK2

Roztok obsahuje β globin



Roztok obsahuje CYP

Roztok obsahuje UGT

Roztok obsahuje SULT

2. destička

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GK3	GK3	GK4	GK4	GK5	GK5	GK6	GK6	HK2	HK2	HK3	HK3
B	HK4	HK4	HK5	HK5	HK6	HK6	NE1	NE1	NE2	NE2	NE3	NE3
C	GK3	GK3	GK4	GK4	GK5	GK5	GK6	GK6	HK2	HK2	HK3	HK3
D	HK4	HK4	HK5	HK5	HK6	HK6	NE1	NE1	NE2	NE2	NE3	NE3
E	GK3	GK3	GK4	GK4	GK5	GK5	GK6	GK6	HK2	HK2	HK3	HK3
F	HK4	HK4	HK5	HK5	HK6	HK6	NE1	NE1	NE2	NE2	NE3	NE3
G	GK3	GK3	GK4	GK4	GK5	GK5	GK6	GK6	HK2	HK2	HK3	HK3
H	HK4	HK4	HK5	HK5	HK6	HK6	NE1	NE1	NE2	NE2	NE3	NE3

Roztok obsahuje β globin

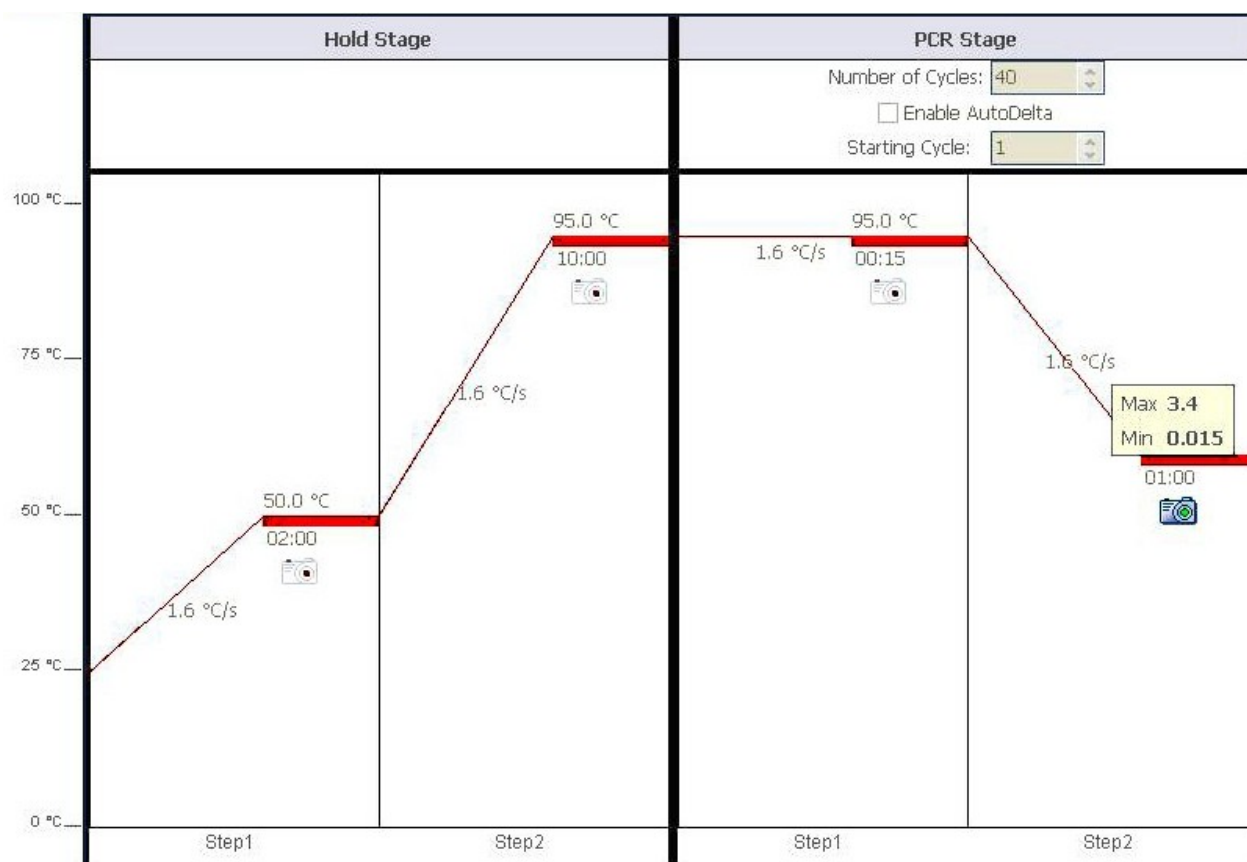


Roztok obsahuje CYP

Roztok obsahuje UGT

Roztok obsahuje SULT

Po skončení pipetování jsme přelepili celou destičku speciální fólií, dále stočit a vložili do qPCR a na přístroji spustili příslušný program.



Obr. 14 Použitý program real-time PCR

Použité statistické metody

Data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Vzhledem k malému počtu měření byl k mnohočetnému porovnávání vzorků použit Kruskal-Wallisův neparametrický test s post-hoc analýzou, k porovnávání dvou skupiny byl použit neparametrický Mann-Whitneyho test.

Hodnota $p \leq 0,05$ je považována za signifikantní.

3. VÝSLEDKY

3.1 Biochemické parametry séra

U všech experimentálních zvířat byly stanoveny klíčové sérové biochemické parametry (viz Tabulka 1.).

Tabulka 1. Biochemické parametry ze séra jednotlivých experimentálních zvířat

Kmen potkana	Bilirubin (μmol/l)	TBA - Celkové žlučové kyseliny (μmol/l)	ALT (μkat/l)	AST (μkat/l)	ALP (μkat/l)	CB - Celková bílkovina (g/l)	m - hmotnost potkana (g)	m játra - hmotnost játra (g)	CRP (mg/l)
Het Ctrl									
NC1	1,1	29	1,29	1,89	1,76	59,6	285	10,1	0
NC2	1,6	14	0,77	1,25	0,94	65,3	300	9,6	0,1
HK2	1,9	9	0,94	1,95	1,5	67,2	590	19	2,3
HK3	3,2	8	1,59	2,33	1,72	63,7	575	18,3	1,8
HK4	2,1	8	0,84	1,56	1,6	70,9	656	18,7	1,9
HK5	2,1	8	1,3	1,66	1,6	64,9	520	15,2	2
HK6	2,7	8	1,29	1,86	1,74	67,6	590	17,1	2,3
Het EE									
NE1	1,7	7	1,21	1,97	4,39	60,4	230	11,9	0
NE2	1,4	4	0,82	1,59	2,58	60,1	300	11,5	0
NE3	2,6	26	1,05	1,83	5,54	59,7	270	13,7	0,1
Gunn Ctrl									
GK1	169,5	8	0,59	1,33	0,68	54,9	430	12,8	4,5
GK2	122,6	8	1,7	2,66	0,65	56,4	525	17,8	3,5
GK3	180,4	8	2,77	3,03	0,74	58,8	510	16,4	3,2
GK4	116,7	8	1,24	2,08	0,76	56,4	395	12,4	3,3
GK5	136,4	8	1,04	1,85	0,8	65,6	535	19,8	3,8
GK6	120,9	8	2,49	2,67	0,77	63,9	570	19,7	3,8
GC1	93,4	96	0,81	1,17	1,51	61,5	215	9,4	0,2
GC2	83,2	28	1,38	1,42	2,37	72,7	220	12,08	0,1
GC3	107,9	4	0,9	1,14	2,39	61,8	275	14,9	0
Gunn EE									
GE1	100	264	1,44	1,5	5,61	72,2	250	17,16	0,1
GE2	124,6	216	1,19	1,68	7,15	61,9	220	12,13	0,1
GE3	112	105	1,22	1,51	3,49	61,2	200	11,67	0
GE4	80,5	259	2,57	2,51	5,67	71,2	200	12,74	0
GE5	87,3	161	1,25	1,69	10,04	64,7	220	12,44	0

Výsledky naměřené na automatickém analyzátoru Modular. Barevné označení je pro jednotlivé skupiny zachovááno.

V séru všech experimentálních zvířat byly stanoveny markery cholestázy-bilirubin, ALP a celkové žlučové kyseliny. Všechny tyto hodnoty jsme očekávali zvýšené u zvířat, kterým byl aplikován EE.

Zjistili jsme, že po 5-ti dnech aplikace EE byl bilirubin významně vyšší pouze u obou skupin potkanů kmene Gunn, aplikace EE neměla na sérové hladiny celkového bilirubinu vliv (viz Tabulka 2.). Na rozdíl od bilirubinu, aktivita ALP byla významně zvýšena po aplikaci EE u Gunnových potkanů, mírné zvýšení u heterozygotů nedosáhlo statistické významnosti. Sérové hladiny žlučových kyselin jsou jedním z nejcitlivějších markerů cholestatického poškození jater. Aplikace EE vedla k 10-ti násobnému nárůstu koncentrace žlučových kyselin v séru, značící těžký stupeň cholestázy, zatímco u heterozygotních zvířat po 5-ti denní aplikaci EE se sérové hladiny žlučových kyselin nezměnily (viz Tabulka 2.).

Tabulka 2. Markery cholestázy u EE indukované cholestázy.

	Het Ctrl	Het EE	Gunn Ctrl	Gunn EE
Bilirubin($\mu\text{mol/l}$)	2,1\pm0,64	1,9\pm0,51	125,67\pm30,38*	100,88\pm16,04*
ALP ($\mu\text{kat/l}$)	1,55\pm0,26	4,17\pm1,22	1,19\pm0,68	6,39\pm2,17*
ŽK ($\mu\text{mol/l}$)	12,00\pm0,23	12,33\pm9,74	19,56\pm27,81	201,00\pm60,62*†

*Markery cholestázy byly významně zvýšeny u potkanů kmene Gunn po 5-ti denní aplikaci ethinylestradiolu. Bilirubin nelze u potkanů kmene Gunn považovat za marker cholestázy, neboť jeho sérové hladiny jsou vysoké díky vrozenému defektu UGT-glukuronyltransferasy. * $p \leq 0,05$ vs Het Ctrl, † $p \leq 0,05$ vs Gunn Ctrl.*

Dále byly v séru experimentálních zvířat stanoveny markery hepatocelulárního poškození jater, a to ALT a AST. Zjistili jsme, že žádné ze zvířat neprokazovalo signifikantně zvýšené hodnoty ALT či AST (viz Tabulka 3), tedy aplikace EE u experimentálních zvířat nevedla k poškození cytoplazmatické membrány (ALT) nebo nekróze (AST) hepatocytů.

Tabulka 3. Markery hepatocelulárního poškození jater u EE indukované cholestázy

	Het Ctrl	Het EE	Gunn Ctrl	Gunn EE
ALT (μkat/l)	1,15 ±0,28	1,03 ±0,16	1,44 ±0,71	1,53 ±0,53
AST (μkat/l)	1,79 ±0,31	1,80 ±0,16	1,93 ±0,68	1,78 ±0,37

Všechny hodnoty $p > 0,05$.

Stanovovali jsme též celkovou bílkovinu ze séra experimentálních zvířat. Stanovení celkové bílkoviny nám poskytuje orientační informaci o biosyntéze, vylučování a využití bílkovin a rovněž o hydrataci organismu. Nejvíce zastoupenou složkou sérových bílkovin je albumin, který je syntetizován v játrech a pokles jeho sérových hladin může souviset i se sníženou syntetickou funkcí jater. Z naměřených výsledků jsme zjistili, že žádná skupina zvířat neprokazovala zvýšené nebo snížené hodnoty CB a experimentální skupiny lze považovat skupiny z pohledu hodnot CB za srovnatelné.

Stanovením CRP jsme chtěli vyloučit probíhající zánět u experimentálních zvířat. Hodnoty CRP jsme neočekávali zvýšené u žádné skupiny zvířat, protože zvířata měla být zdravá, bez probíhajícího zánětu. Zjistili jsme, že skupina Gunn Ctrl měla vůči skupině Gunn EE mírné zvýšení CRP, které dosáhlo statistické významnosti (viz Tabulka 4). Předpokládáme však, že zvířata skupiny Gunn Ctrl netrpěla zánětem a statisticky významný výsledek je způsoben tím, že skupina Gunn EE má hodnoty CRP velmi nízké (nulové), a tudíž se to při jejich porovnávání projevilo. Navíc jsou všechny hodnoty v referenčním rozmezí, které je do 8mg/l. Z tohoto důvodu lze považovat skupiny z pohledu hodnot CRP za srovnatelné a můžeme vyloučit probíhající zánětlivé onemocnění v době odběru.

Tabulka 4. Sérové hladiny celkové bílkoviny a CRP u EE indukované cholestázy

	Het Ctrl	Het EE	Gunn Ctrl	Gunn EE
Celková bílkovina (g/l)	65,6 ±3,27	60,1 ±0,29	61,3 ±5,28	66,2 ±4,62
CRP (mg/l)	1,5 ±0,92	0,0 ±0,05	2,5 ±1,73	0,0 ±0,05*

* $p \leq 0,05$ vs Gunn Ctrl

Potkany jsme před zahájením experimentu zvážili, po usmrcení a odběru orgánů jsme zvážili i jejich játra. Naměřená hmotnost jater byla statisticky zhodnocena,

výsledky potvrdili, že hmotnost jater se mezi jednotlivými skupinami významně neodlišuje.

Před začátkem experimentu byli potkani náhodně rozděleni do kontrolních a experimentálních skupin a jejich váha se mezi kontrolními a EE skupinami nelišila. Potkani kmene Gunn jsou všeobecně menší než odpovídající heterozygotní potkani stejného stáří. Aplikace EE vedla k redukci hmotnosti u obou skupin potkanů, nicméně statistické významnosti dosáhla pouze u skupiny Gunn, důvodem je zřejmě malé množství zvířat ve skupině Het EE (viz Tabulka 5).

Tabulka 5. Hmotnosti experimentálních zvířat a jater

	Het Ctrl	Het EE	Gunn Ctrl	Gunn EE
hmotnost jater (g)	15,4±3,72	12,4±0,96	15,0±3,44	13,2±2,00
hmotnost potkana (g)	502±137,71	267±28,67	408±132,25	218±18,33*

*p≤0,05 vs Het Ctrl

3.2 Koncentrace RNA

Ze vzorků jater uložených při -80⁰C v RNA Later byla postupem popsáním v kapitole Metodika izolována RNA v dostatečné koncentraci a čistotě (viz. Tab. 6)

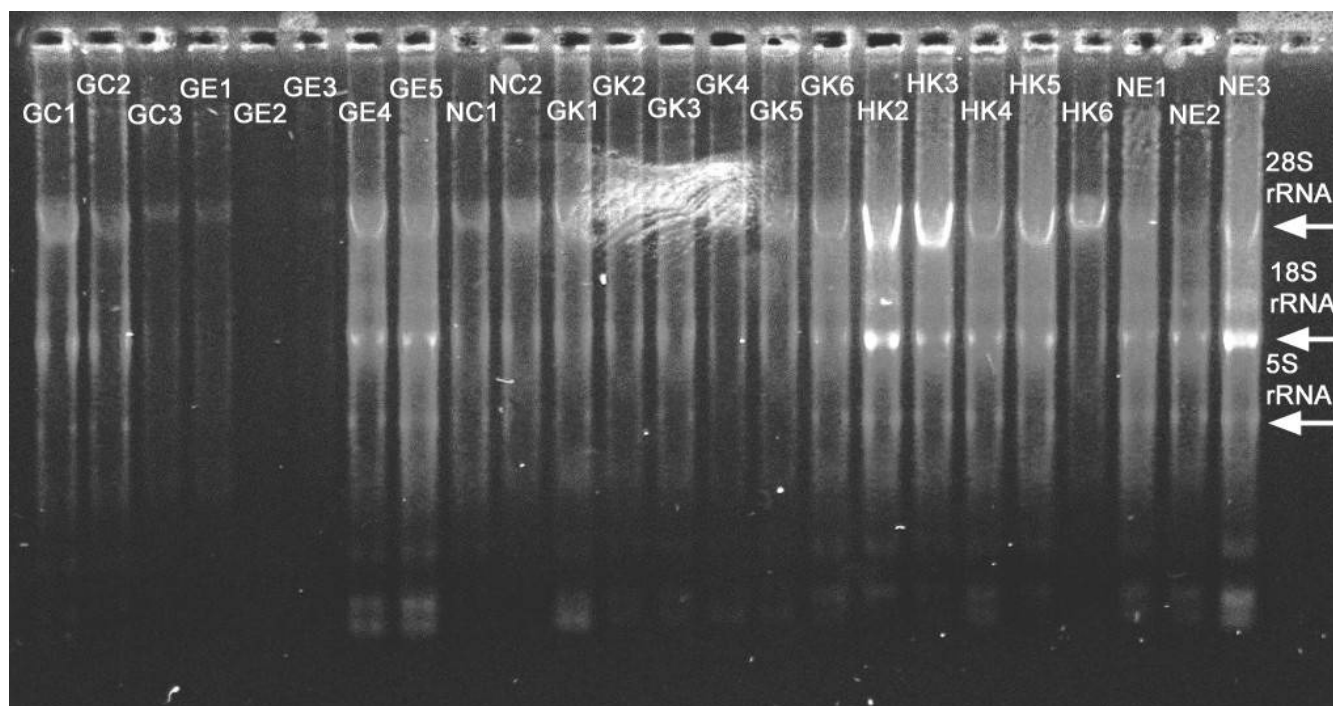
Tabulka 6. Stanovení koncentrace a čistoty RNA spektrofotometricky

označení potkanů	koncentrace RNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	absorbance 260/280	absorbance 260/230
GC1	433	2,06	2,02
GC2	731	2,11	2,06
GC3	683	2,11	2,02
GE1	641	2,12	2,03
GE2	537	2,12	1,97
GE3	610	2,11	2,01
GE4	710	2,09	2,02
GE5	844	2,11	2,04
NC1	641	2,10	1,96
NC2	661	2,09	1,97
GK1	643	2,09	1,89
GK2	584	2,10	1,84
GK3	617	2,10	1,90
GK4	583	2,09	1,87
GK5	675	2,10	1,93
GK6	677	2,09	1,91
HK2	672	2,08	1,86
HK3	868	2,09	1,92
HK4	950	2,09	1,96
HK5	846	2,10	1,98
HK6	711	2,11	1,94
NE1	719	2,10	1,98
NE2	743	2,09	1,98
NE3	928	2,12	2,03

3.2.1. Elektroforéza

Byla provedena elektroforetická kontrola RNA, kde jsme hodnotili ribozomální rRNA, a to její podjednotky 28S, 18S a 5S (viz obr. 15). Rozložení RNA na gelu odpovídá

očekávanému elektroforetickému záznamu, s RNA můžeme dále pracovat a použít ji na přepis do cDNA. U vzorků GC3 – GE3 je slabší signál, neboť při pipetování na gel se mi nepodařilo dostat celé množství RNA do příslušné jamky. Dle výsledků koncentrace RNA by však měly být veškeré vzorky v pořádku.



Obr. 15 Výsledek elektroforetické kontroly RNA

3.3. qPCR

Pro stanovení exprese mRNA byly vybrány klíčové geny podílející se na metabolismu estrogenů: *CYP 1A2*, *SULT1A1* a *UGT1A1*. Jako referenční (house-keeping) gen byl použit β globin (viz Tabulka 7).

Tabulka 7. Hodnoty relativní exprese mRNA pro *UGT1A1*, *CYP1A2* a *SULT1A1*. β globin byl použit jako referenční (house-keeping) gen.

7A. CYP1A2

kmen potkana	globin CT	CYP1A2 CT	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	relat.exprese	relat. exprese %
HK2	17,502	20,044	2,541	0,482	0,716	72%
HK3	17,318	19,377	2,060	0,000	1,000	100%
HK4	17,933	19,818	1,885	-0,174	1,128	113%
HK5	17,991	20,135	2,144	0,085	0,943	94%
HK6	18,214	19,349	1,134	-0,925	1,899	190%
NC1	17,279	20,265	2,986	0,926	0,526	53%
NC2	16,868	19,425	2,557	0,497	0,708	71%
NE1	18,280	20,693	2,413	0,353	0,783	78%
NE2	18,649	21,109	2,460	0,400	0,758	76%
NE3	18,008	20,759	2,751	0,691	0,619	62%
GK1	15,894	19,248	3,353	1,294	0,408	41%
GK2	16,026	18,845	2,819	0,759	0,591	59%
GK3	18,237	19,467	1,230	-0,830	1,778	178%
GK4	18,412	19,128	0,716	-1,344	2,539	254%
GK5	17,114	18,963	1,849	-0,210	1,157	116%
GK6	17,409	18,561	1,152	-0,908	1,876	188%
GC1	16,869	18,621	1,753	-0,307	1,237	124%
GC2	17,571	19,187	1,616	-0,444	1,360	136%
GC3	18,168	20,202	2,035	-0,025	1,017	102%
GE2	17,106	19,592	2,486	0,426	0,744	74%
GE1	16,525	20,725	4,201	2,141	0,227	23%
GE3	17,321	20,484	3,163	1,103	0,465	47%
GE4	17,003	20,028	3,025	0,965	0,512	51%
GE5	16,922	19,046	2,124	0,064	0,956	96%

7B. UGT1A1

kmen potkana	globin CT	UGT1A1 CT	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	relat.exprese	relat. exprese %
HK2	18,963	22,740	3,776	-0,579	1,494	149%
HK3	18,561	22,916	4,355	0,000	1,000	100%
HK4	20,044	23,524	3,480	-0,875	1,834	183%
HK5	19,377	23,294	3,916	-0,439	1,356	136%
HK6	19,818	23,215	3,396	-0,959	1,944	194%
NC1	20,725	23,797	3,072	-1,283	1,078	108%
NC2	20,484	23,665	3,180	-1,175	1,000	100%
NE1	20,135	22,802	2,667	-1,689	3,224	322%
NE2	19,349	21,545	2,196	-2,159	4,467	447%
NE3	20,693	22,533	1,840	-2,515	5,718	572%
GK1	20,028	24,002	3,973	-0,382	0,577	58%
GK2	19,046	23,923	4,877	0,522	0,309	31%
GK3	18,649	25,704	7,055	2,700	0,154	15%
GK4	18,008	24,323	6,315	1,960	0,257	26%
GK5	19,467	23,025	3,558	-0,797	1,738	174%
GK6	19,128	23,487	4,359	0,004	0,997	100%
GC1	17,279	22,831	5,553	1,197	0,193	19%
GC2	16,868	23,378	6,510	2,155	0,099	10%
GC3	15,894	24,758	8,863	4,508	0,019	2%
GE2	16,026	24,164	8,138	3,783	0,032	3%
GE1	18,621	23,504	4,883	0,527	0,307	31%
GE3	19,187	24,898	5,711	1,356	0,173	17%
GE4	20,202	22,957	2,754	-1,601	1,344	134%
GE5	19,592	23,730	4,138	-0,218	0,515	52%

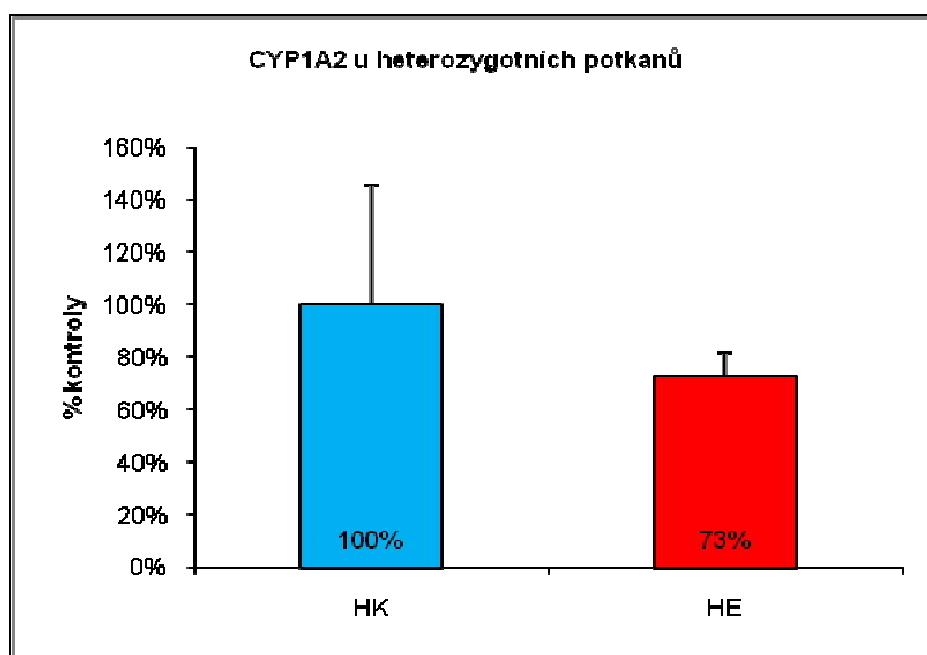
7C. SULT1A1

kmen potkana	globin CT	SULT1A1 CT	Δ ct	$\Delta\Delta$ ct	relat.exprese	relat. exprese %
HK2	21,109	20,772	-0,337	0,603	0,658	66%
HK3	20,759	19,819	-0,940	0,000	1,000	100%
HK4	25,704	19,820	-5,884	-4,944	30,775	3078%
HK5	24,323	20,169	-4,154	-3,214	9,281	928%
HK6	23,025	20,350	-2,675	-1,735	3,328	333%
NC1	18,845	23,578	4,733	5,673	0,018	2%
NC2	23,378	22,318	-1,060	-0,120	1,000	100%
NE1	23,487	22,375	-1,112	-0,172	1,127	113%
NE2	22,740	22,943	0,203	1,143	0,453	45%
NE3	22,916	22,404	-0,512	0,428	0,743	74%
GK1	24,758	20,777	-3,981	-3,041	7,575	757%
GK2	24,164	20,609	-3,555	-2,615	5,639	564%
GK3	19,818	20,996	1,177	2,117	0,230	23%
GK4	20,135	20,847	0,712	1,652	0,318	32%
GK5	19,349	19,852	0,503	1,443	0,368	37%
GK6	20,693	20,063	-0,630	0,310	0,807	81%
GC1	19,592	21,820	2,228	3,169	0,102	10%
GC2	20,725	23,548	2,823	3,763	0,068	7%
GC3	20,484	24,510	4,025	4,965	0,029	3%
GE2	20,028	23,531	3,502	4,442	0,042	4%
GE1	19,046	22,723	3,677	4,617	0,038	4%
GE3	20,265	23,524	3,260	4,200	0,050	5%
GE4	19,425	23,006	3,582	4,522	0,040	4%
GE5	19,248	22,598	3,350	4,290	0,047	5%

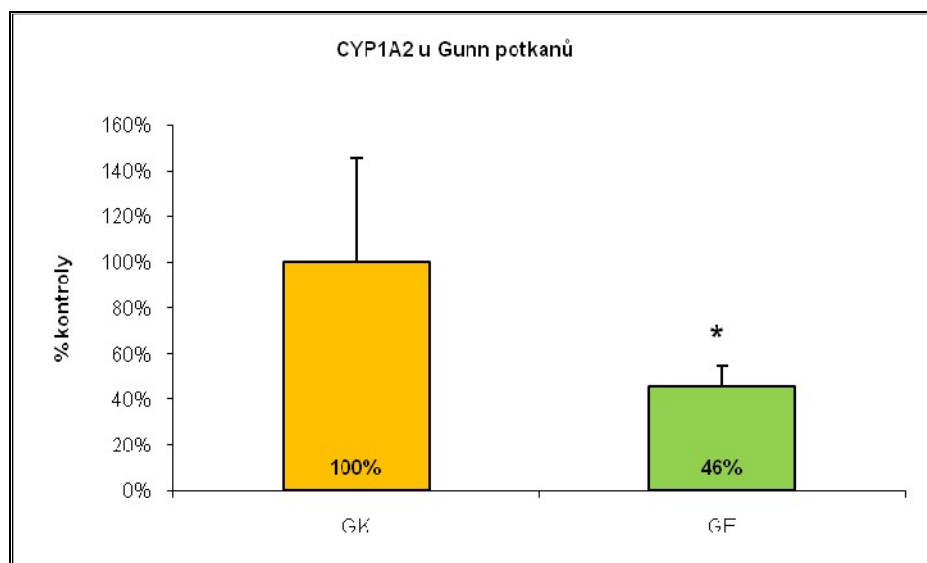
Expresse genu *CYP1A2*

Aplikace ethinylestradiolu vedla k poklesu jaterní exprese *CYP1A2*. U heterozygotních potkanů (viz obr. 16A) tento pokles (73%) nebyl statisticky významný, pokles u skupiny Gunnových potkanů (46%) dosáhl statistické významnosti (viz obr. 16B). Mnočetné porovnávání všech skupiny Kruskal-Wallisovým testem s post hoc analýzu však neukázal statisticky signifikantní rozdíl u žádné ze studovaných skupin (viz obr. 16C).

Obr. 16A Relativní exprese *CYP1A2* u heterozygotních potkanů

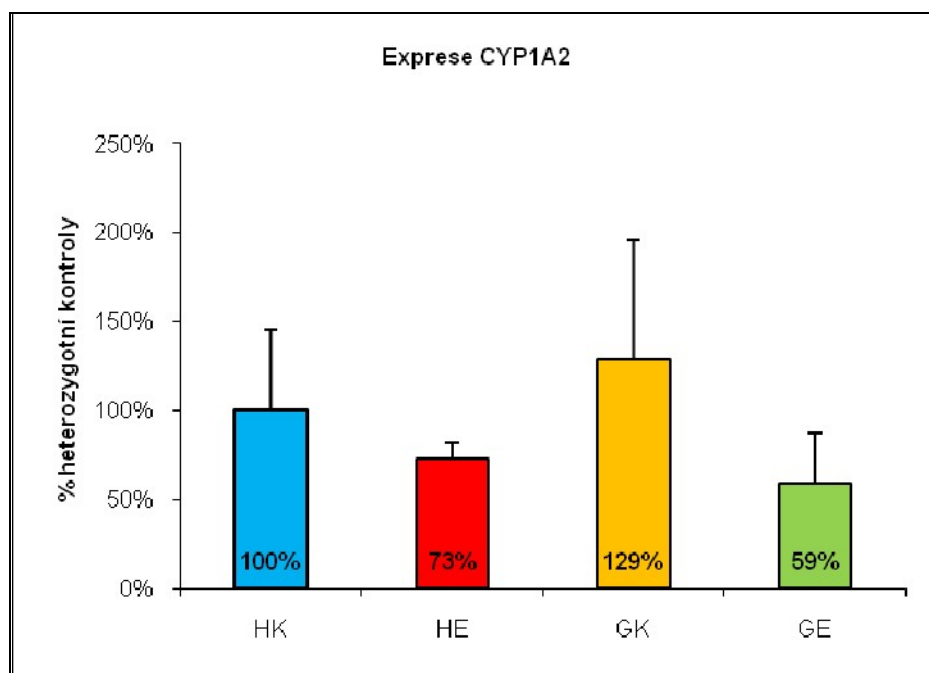


Obr. 16B Relativní exprese *CYP1A2* u potkanů kmene Gunn



* $p=0,03$

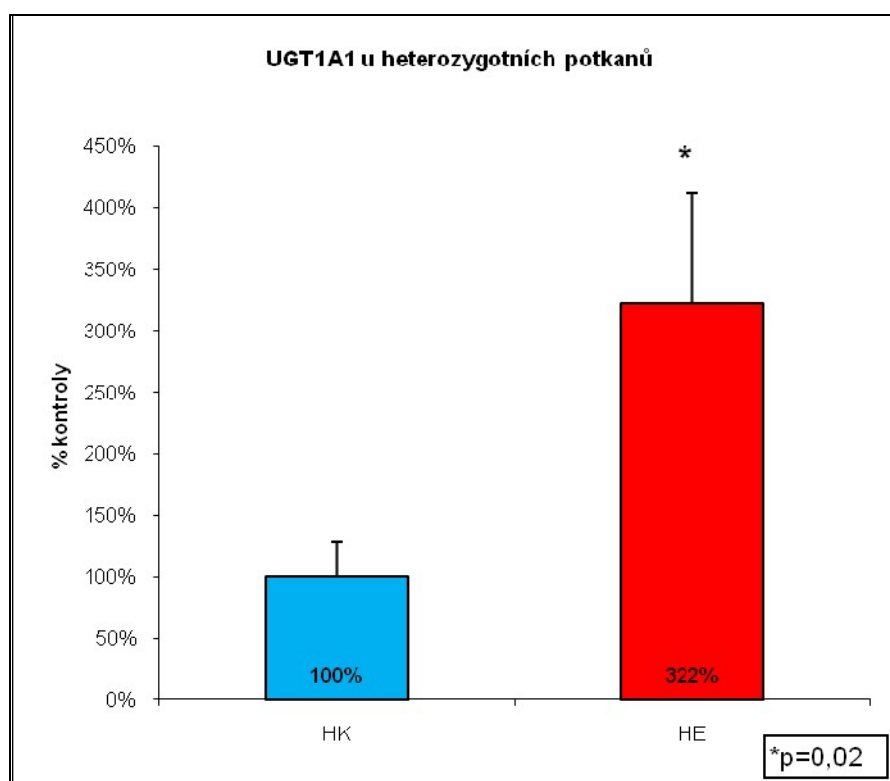
Obr. 16C Relativní exprese *CYP1A2* u všech experimentálních skupin



Expresa genu *UGT1A1*

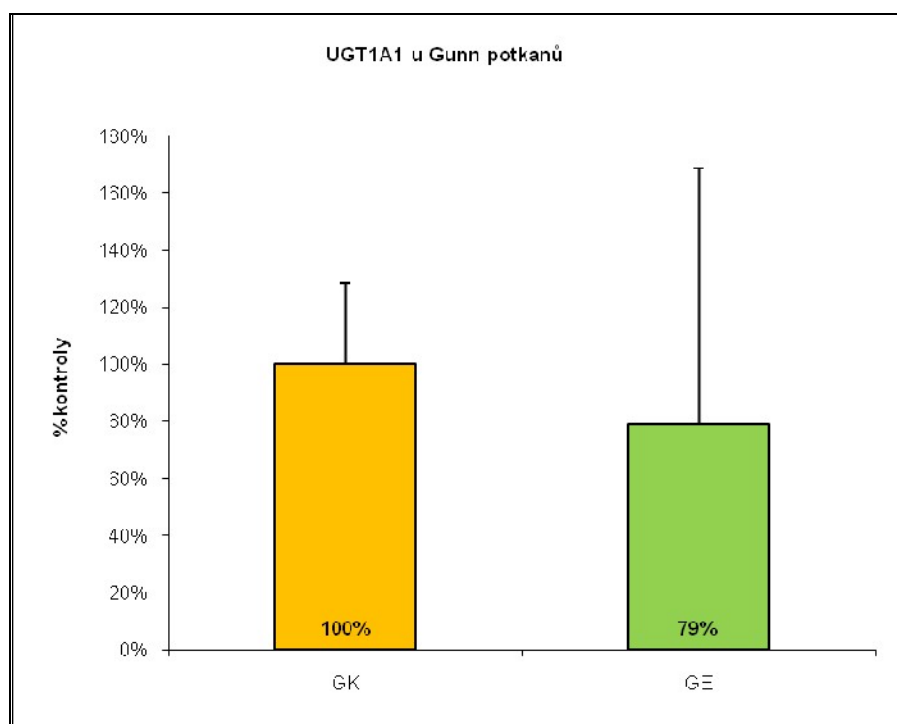
Expresa genu pro *UGT1A1* vzrostla po aplikaci ethinylestradiolu u experimentálních zvířat více než trojnásobně (viz obr. 17A), což potvrzuje jeho význam při metabolismu estrogenů. U potkanů kmene Gunn je tento gen mutován, jeho exprese je nízká a po aplikaci ethinylestradiolu se nemění (viz obr. 17B a C).

Obr. 17A Relativní exprese *UGT1A1* u heterozygotních potkanů

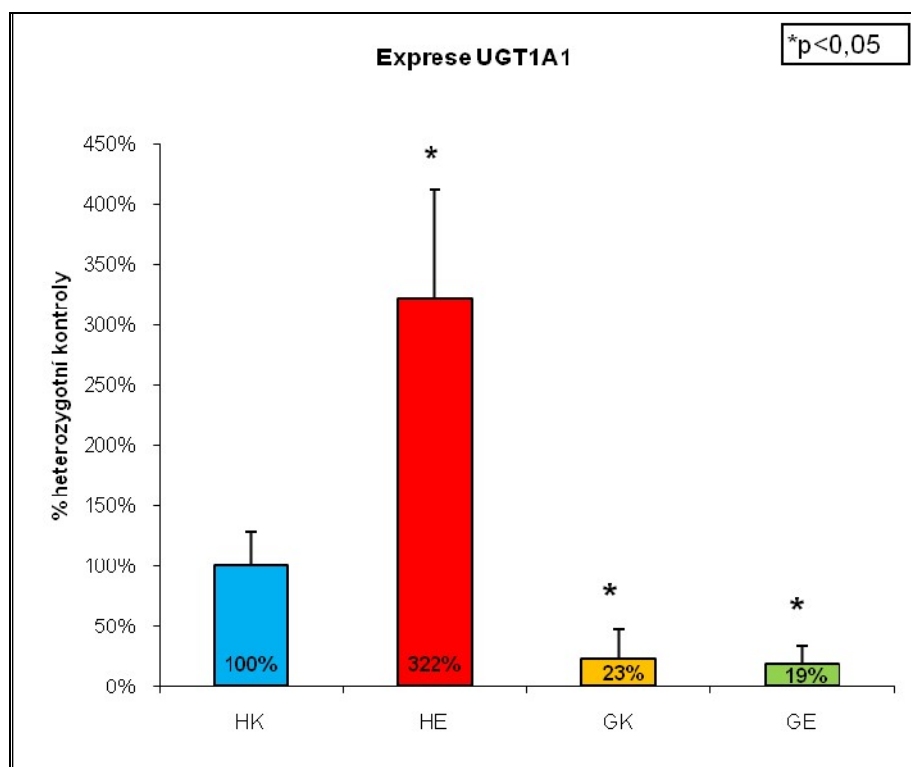


*p=0,02

Obr. 17B Relativní exprese *UGT1A1* u potkanů kmene Gunn



Obr. 17C Relativní exprese *UGT1A1* u všech experimentálních skupin

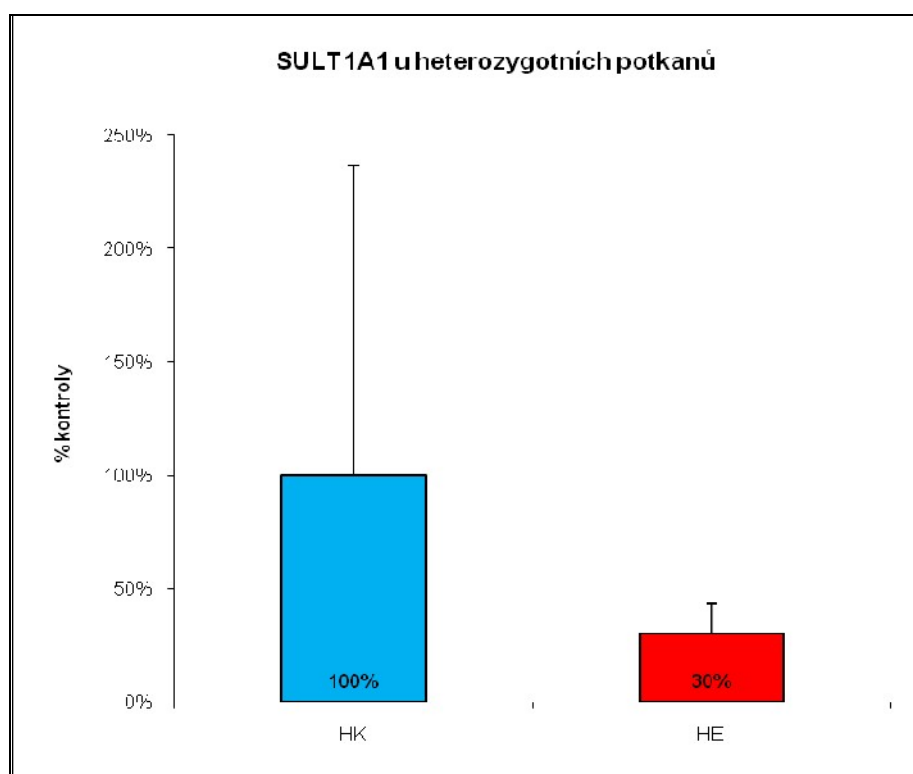


* $p \leq 0,05$

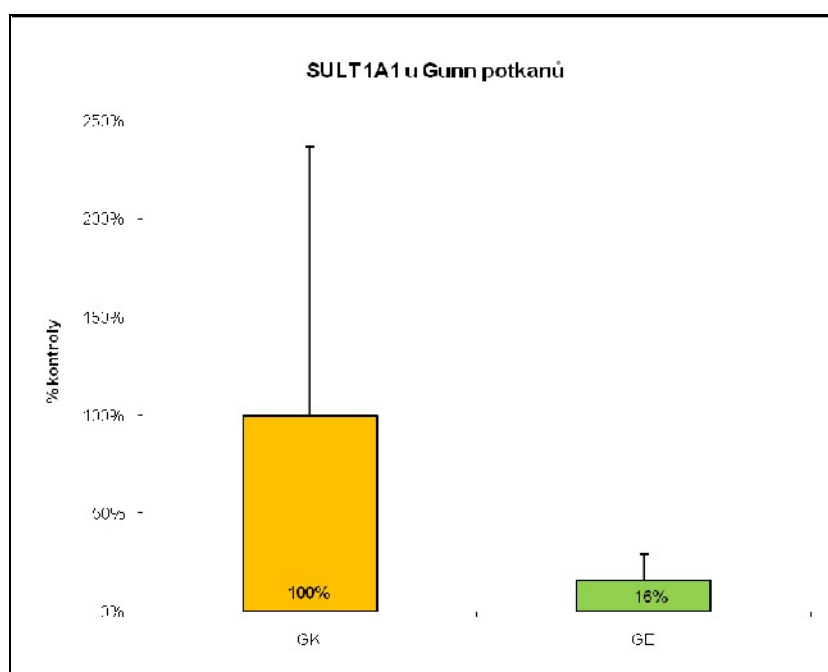
Expresa genu *SULT1A1*

Aplikace ethinylestradiolu vedla ke snížení exprese *SULT1A1* na 30% u heterozygotů (viz obr. 18A) a na 16% u potkanů kmene Gunn (viz obr. 18B) ve srovnání s odpovídajícími kontrolními skupinami. Mnohočetné porovnávání všech experimentálních skupin prokázalo statisticky významné snížení exprese *SULT1A1* u skupiny GE (viz obr. 18C).

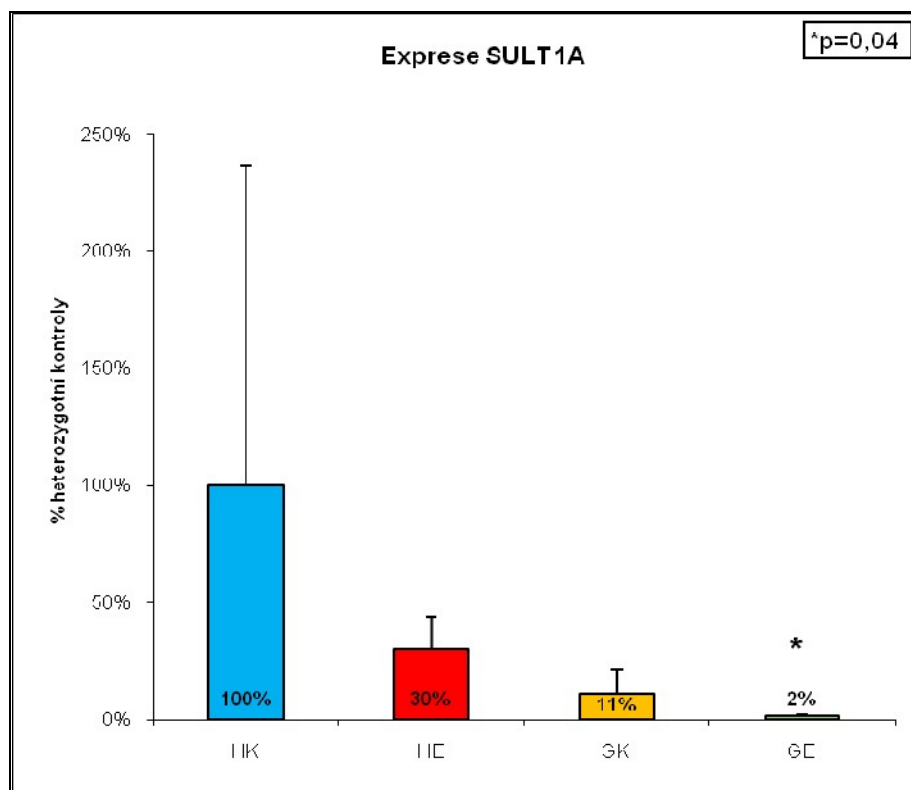
Obr. 18A Relativní exprese *SULT1A1* u heterozygotních potkanů



Obr. 18B Relativní exprese *SULT1A1* u potkanů kmene Gunn



Obr. 18C Relativní exprese *SULT1A1* u všech experimentálních skupin



*p=0,04

4. DISKUZE

Moje práce byla pilotním experimentem, který měl přiblížit metabolismus estrogenů u potkanů, kteří mají deficientní gen *UGT1A1* a jsou tedy vhodným modelem pro výzkum odpovídajících lidských onemocnění.

Experiment byl pilotní z toho důvodu, že je poměrně těžké odchovat dostatečné množství jedinců v inbrední linii, kteří přenášejí požadovanou genetickou mutaci na další populace. Pro správné statistické zhodnocení výsledků by bylo třeba, aby v každé skupině bylo více jak 6 jedinců a tento experiment se provedl v jednom časovém období. Vzhledem k nedostatku vhodných zvířat jsem však byli nuceni nejdříve odebrat část kontrolních zvířat (která byla součástí jiného experimentu) a teprve poté provést experiment menšího rozsahu podle počtu dostupných zvířat.

Proto je ve skupině GE 5 zvířat a ve skupině Het EE pouze 3, a to mohlo ovlivnit statistickou významnost rozdílů biochemických i expresních parametrů mezi jednotlivými skupinami.

Z výsledků je zřejmé, že aplikace ethinylestradiolu (EE) vede u potkanů kmene Gunn k mnohem těžší cholestáze než u heterozygotů. Podání EE vedlo u skupiny Gunn EE k 10ti násobnému nárůstu hodnot celkových žlučových kyselin (TBA), hodnoty ALP vzrostly oproti kontrolní skupině 5,4krát, u heterozygotů k vyvolání cholestázy nedošlo. Abych minimalizovala chybu, kterou do statistik mohl vnést malý počet zvířat ve skupině, vyhledala jsem data z totožného experimentu provedeném v Hepatologické laboratoři ÚKBLD na potkanech kmene Wistar. Jedná se o outbreední kmen bez genetických mutací a u těchto zvířat došlo k mírnému zvýšení markerů cholestázy. Po aplikaci EE měla zvířata dvojnásobný nárůst TBA oproti zvířatům bez EE, a 2,5x vyšší ALP oproti kontrolní skupině. Na základě našeho experimentu lze tedy říci, že vrozený defekt UGT1A1 u potkanů Gunn vede po podání EE k prohloubení cholestatického poškození jater.

U lidí existují dvě onemocnění spojená s tímto defektem, a to Gilbertův syndrom, který má pouze sníženou expresi genu UGT1A1 (tento syndrom se vyskytuje asi u 10% lidské populace) a Crieglerův-Najjarův syndrom I. a II. typu, kde je velmi nízká exprese UGT1A1 anebo gen UGT1A1 zcela chybí a prognóza syndromu je velmi vážná. Jedinci s Gilbertovým syndromem prospívají výborně, z důvodu snížené aktivity glukuronozyltransferázy však existuje předpoklad, že by mohli jinak metabolizovat estrogeny než populace s normální aktivitou transferáz. Jelikož EE je složkou hormonální antikoncepce a v těhotenství hladina lidských estrogenů výrazně stoupá, mohla by být porucha glukuronidace jedním z faktorů podílejících se na vzniku estrogeny indukované cholestázy. S přihlédnutím k výše uvedeným výsledkům by bylo zajímavé provést klinickou studii, která by tyto souvislosti objasnila.

V další části práce jsem se snažila objasnit, co se děje v potkaním organismu po stánci jednotlivých metabolitů a enzymů nutných k detoxifikaci estrogenů. Bylo plánováno, že jednotlivé estrogenové metabolity v séru budou analyzovány pomocí metody HPLC. V této věci jsme i kontaktovali Endokrinologický ústav, kde ovšem zjistili, že námi na námi požadované metabolity nemají zavedenou metodiku. Zavedení metodiky stanovení estrogenových metabolitů a jejich detekce pomocí

HPLC by bylo možná na ÚKBLD, ovšem to vše svým rozsahem a náročností výrazně přesahuje rámec zadání diplomové práce. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli mechanismus estrogenového metabolismu prozkoumat pomocí molekulárně genetických metod a klíčové enzymy metabolismu pomocí TaqMan analýzy.

Estrogeny jsou u potkanů i u lidí metabolizovány pomocí 2 hlavních pochodů, minoritním mechanismem je hydroxylace, methylace a glukuronidace estrogenů (součástí je i UGT1), ovšem hlavní metabolická dráha je sulfatace (zastoupená cca z 60-80%).

Hydroxylace estrogenů vede ke vzniku dvou hlavních metabolitů: 2-hydroxyestradiol a 4-hydroxyestradiol. První z nich je netoxický, pro tělo snadno vyloučitelný, druhý je toxický, karcinogenní a poškozuje buňky. Hlavní CYP podílející se na metabolismu estrogenů v játrech je CYP1A2, jehož působením vzniká netoxický 2-hydroxyestradiol. Výsledkem analýzy exprese CYP1A2 je signifikantně snížená exprese u skupiny Gunn EE vůči kontrolní skupině Gunn. U heterozygotních zvířat po podání EE ke statisticky významnému snížení exprese nedošlo, to může být však zapříčiněno malým množstvím zvířat skupině Het EE. Stejně tak nebylo statisticky významné srovnání všech skupin vůči heterozygotní kontrole. Naše hypotéza je taková, že hepatické poškození u UGT1A1 deficientních zvířat by mohlo způsobit snížení exprese CYP1A2 a následné hromadění toxického metabolitu 4-hydroxyestradiolu. Tento metabolit vzniká působením CYP1B1 v uteru a ováriích. Pro potvrzení hypotézy by bylo potřeba provést nový experiment a zvířatům odebrat uterus a ovária a změřit expresi CYP1B1 a rovněž relativní zastoupení 4 a 2 hydroxymetabolitů estradiolu v séru.

Exprese genu UGT1A1, jehož enzymy jsou zapojeny do procesu glukuronidace (2. fáze detoxifikace) byla po aplikaci EE u heterozygotních potkanů statisticky významně zvýšená. Indukce tohoto enzymu po podání EE potvrzuje hypotézu, že UGT1A1 je významným enzymem podílejícím se na metabolismu estrogenů. Potkani Gunn mají mutovaný gen pro UGT1A1, který nevede k syntéze funkčního proteinu. Jeho exprese je malá a není ovlivněna působením EE.

SULT patří stejně jako UGT k enzymům II. fáze metabolismu. Sulfatace je důležitý detoxifikační krok, porucha v jejím fungování může vést dokonce k hromadění toxických metabolitů a poškození jater. V játrech je hlavní sulfotransferázou SULT1A1. Podání EE vedlo k překvapivému poklesu exprese SULT1A1, signifikantní pokles exprese je zřejmý především u skupiny Gunn EE. Je

možné, že pokud by bylo více zvířat ve skupině Het EE, tak by bylo statisticky významné snížení exprese i u této skupiny. Estrogeny ovšem nejvíce metabolizuje SULT1E1 a její exprese byla změřena v hepatologické laboratoři ÚKBLD. Exprese genu po podání EE je více jak 20-ti násobně vyšší u heterozygotních potkanů ve srovnání s kontrolami, to znamená, že SULT1E1 se podílí na metabolismu estrogenů u heterozygotních potkanů. Exprese genu u skupiny Gunn EE je pouze 2x vyšší ve srovnání s Gunn Ctrl, to znamená, že podání EE zvýší produkci SULT1E1, ale zdaleka ne tak výraznou měrou jako u skupiny heterozygotů. Je tedy zřejmé, že metabolismus estrogenů bude u potkanů kmene Gunn zásadně odlišný od potkanů s normální aktivitou UGT, neboť kromě defektní UGT1A1 mají též sníženou expresi CYP1A2 a SUL1A1 a rovněž exprese SULT1E1 je pouze dvojnásobná oproti dvacetinásobnému zvýšení u kontrol.

Z tohoto pilotního experimentu se podařilo se získat zajímavá data, která by stála za to prozkoumat hlouběji. Bylo by nutné zavést metodiku HPLC estrogenových metabolitů a provést definitivní experiment s větším počtem zvířat (bohužel chovaná linie byla postižena onemocněním a bude ji třeba nahradit, což bude časově a finančně náročný proces). Dále bude třeba experimentální zvířatům odebrat i jiné orgány, než játra, které jsou důležité pro metabolismus estrogenů, a to především uterus a ovaria, a změřit v nich expresi většího spektra genů podílejících se na metabolismu estrogenů.

5. ZÁVĚR

- Deficit genu UGT1A1 vede po aplikaci k ethinylestradiolu k rozvoji těžké cholestázy.
- UGT1A1 hraje důležitou roli v metabolismu estrogenů, jeho exprese je po aplikaci EE několikanásobně zvýšená u heterozygotních potkanů.
- Aplikace EE snižuje expresi CYP1A2, což může mít vliv na zvýšení toxických metabolitů estrogenů.
- Snížení SULT1A1 u potkanů kmene Gunn může vést k ovlivnění metabolismu 2. fáze a poruše exkrece hepatotoxických látek

- Tato experimentální data mohou být základem ke klinické studii, která by objasnila vztah mezi estrogény indukovanou cholestázou a snížení nebo chybění aktivity UGT1A1 u lidí.

6. LITERATURA

- 1) ALBERTS, Bruce, et al. *Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-2-0.
- 2) MARTAN, Lukáš; CITTERBART, Alois. *Gynekologie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2008. 319 s. ISBN 978-80-7262-501-7.
- 3) GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vydání. Praha : Galén, 2005. 890 s. ISBN 80-7262-311-7
- 4) Estrogen. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida) : Wikipedia Foundation, [cit. 2011-04-16]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Estrogen>>
- 5) LUU-THE, V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase.. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2001, 76, s. 143-151
- 6) PALMIERI, C; CHENG, GJ; SAJI, S. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002, 9, s. 1-13
- 7) TREMBLAY, A; TREMBLAY, GB; LABRIE, F. Ligand– independent recruitment of SRC–1 to estrogen receptor through phosphorylation of activation function AF–1. *Mol. Cell*. 2000, 199, s. 513–519.
- 8) KUSHNER, PJ; AGARD, DA; GREENE, GL; SCANLAN, TS. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 74, s.311-317.
- 9) KUMAR, V; GREEN, S; STACK, G; BERRY, M; JIN, JR; CHAMBON P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987, 51, s. 941-51.
- 10) KATO, S; ENDOH, H; MASUHIRO, Y; KITAMOTO, T; SASAKI, H; CHAMBON, P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995, 270, s. 1491-4.
- 11) McKenna, NJ; Lanz, RB; O'MALLEY, BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999, 20, s- 321-344.

- 12) HANUKOGLU, Israel. Sterodogenic enzyme- Structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1992, 1992, s. 65-75.
- 13) ŠIDLOVÁ, Adéla. *Vliv estrogenů na spermie savců*. Praha, 2010. 36 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova.
- 14) SMITH, Carolyn. Multiple Intracellular Signaling Pathways Cross-Talk with the Estrogen Receptor. *Journal of Medicinal Food*. 1999, 2, 3-4, s. 177-177.
- 15) KLINGENBERG, M., Pigments of Rat Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1958, 75(2), s. 376-386.
- 16) OMURA, T. ; SATO, R., A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(4), s. 1375-1376.
- 17) STERN, J.O. ; PEISACH, J., Model Compound Study of Co-Adduct of Cytochrome-P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249(23), s. 7495-7498.
- 18) DOSTÁLEK, M., PISTOVČÁKOVÁ, J., MINAŘÍKOVÁ, V., JUŘIČA, J., TOMANDL, J., HADAŠOVÁ, E., Effect of acute and subchronic administration of methamphetamine on activity of CYP2D in isolated perfused rat liver. *Acta Veterinaria Brno*, 74, s. 339-345, 2005.
- 19) PROMISE, The Prosthetic groups and Metal Ions in Protein Active Sites Database Version 2.0, Online Database, citováno: 1 August 2011 <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/>.
- 20) JUŘIČA, J., Methods and results of pharmacokinetic research at the department of pharmacology, faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech republic. *Biomedical Papers* 151. Univerzita Palackého, s. 38-39, 2007.
- 21) SUHARA, K., et al., Purification and Properties of NADPH-Adrenodoxin Reductase from Bovine Adrenocortical Mitochondria. *FEBS Letters*, 1972, 28(1), s. 45-7.
- 22) OMURA, T., Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 266(3), s. 690-698.
- 23) JUŘIČA, Jan. *STANOVENÍ ISOFOREM CYTOCHROMU P450 PRO KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ VYUŽITÍ*. Brno, 2008. 110 s. Dizertační práce. MASARYKOVA UNIVERZITA LÉKAŘSKÁ FAKULTA.
- 24) PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P., Transcriptional regulation of the genes encoding the cytochrome P-450 steroid hydroxylases. *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications*, 1995, 51, s. 339-370.

- 25) SANDERSON, T; M. van den BERG, Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway, *Pure and Applied Chemistry*, 2003, 75 (11-12), s. 1957-1971.
- 26) MUCHOVÁ, Veronika. *OVLIVNĚNÍ PRODUKCE STEROIDŮ XENOBIOTIKY*. Brno, 2008. 48 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- 27) MURRAY, G. I., et al., Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer research*, 1997, 57, s. 3026-3031
- 28) STIBOROVÁ, M., HUDEČEK, J., HODEK, P., FREI, E., Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy*, 1999, 93, s. 229-237
- 29) WHITLOCK, JP Jr., Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1999, 39, s. 103-125
- 30) NEBERT, D. W. ; DALTON, T. P., The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Natural reviews cancer*, 2006, 6, s. 947-960
- 31) MA, Q., Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Current drug metabolism*, 2001, 2, s. 149-164
- 32) BRIAN WR., et al., Catalytic activities of human liver cytochrome P-450IIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 1990, 29 (51),s. 11280-11292.
- 33) GELLNER K., et al., Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene, *Pharmacogenetics*, 2001, 11 (2),s. 111-121.
- 34) FRÝBORTOVÁ, Michaela . *Úloha c-Jun-N-terminální kinasy v regulaci CYP3A4*. Olomouc, 2010. 62 s. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
- 35) LAMBDA, JK., LIN, Y.S., SCHUETZ, EG., THUMMEL, KE., Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54 (10),s. 1271-1294.
- 36) MURRAY, G. I., et al., Regulation, function, and tissue – specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2001, 41, s. 297-316
- 37) SISSUNG, T. M., PRICE, D. K., SPARREBOOM, A., FIGG, W. D., Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: implications in

hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. *Molecular cancer research*, 2006, 4, s. 135-150

- 38) HAKKOLA, J., et al., Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells. *Carcinogenesis*, 1997, 18, s. 391-397
- 39) SKÁLOVÁ, L., WSÓL, V., SZOTÁKOVÁ, B., BOUŠOVÁ, I., PÁVEK, P., VONDRÁČEK, J., MACHALA, M., SOUČEK, P., *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, 2011 - *publikace v tisku*
- 40) SVOBODOVÁ, Jana. *EXPRES CYTOCHROMU P450 1B1 V NORMÁLNÍCH A NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH*. Brno, 2011. 40 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.
- 41) SANDERSON, J. T., The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences*, 2006, 94 (1), s. 3-21.
- 42) LABRIE, F., SIMARD, J. et al., Structure, Function and Tissue-Specific Gene-Expression of 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 5-Ene-4-Ene Isomerase Enzymes in Classical and Peripheral Intracrine Steroidogenic Tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 43 (8), s. 805-826.
- 43) INANO, H., ISHIOHBA, H. et al., Purification and Properties of Enzymes Related to Steroid-Hormone Synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 595, s. 17-25.
- 44) GLATT H., Sulfation and sulfotransferases 4: bioactivation of mutagens via sulfation. *The FASEB Journal*, 1997, 11, s. 314-321.
- 45) ZHANG H., et al., Sulfuryltransfer: the catalytic mechanism of human estrogen sulfotransferase. *J Biol Chem*, 1998, 273, s. 10888-10892.
- 46) GLATT, H.R., Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact*, 2001, 129, s. 141-170.
- 47) RICHES Z., STANLEY E.L., BLOOMER J.C., COUGHTRIE M.W., Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT —Pie—. *Methods Mol Biol*, 2009, 640, s. 309-26.
- 48) YASUDA S., SUIKO M., LIU M.C., Oral contraceptives as substrates and inhibitors for human cytosolic SULTs. *J Biochem*, 2005, 137(3), s. 401-6.
- 49) RUNGE-MORRIS M., KOCAREK T.A., Regulation of sulfotransferases by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab*, 2005, 6, s. 299-307.

- 50) GHAZALI RA., WARING RH., The effects of flavonoids on human phenolsulphotransferases: potential in drug metabolism and chemoprevention. *Life Sci*, 1999, 65, s. 1625-1632.
- 51) NAGAR S., WALTHER S., BLANCHARD RL., Sulfotransferase (SULT) 1A1 polymorphic variants *1, *2, and *3 are associated with altered enzymatic activity, cellular phenotype, and protein degradation. *Mol Pharmacol*, 2006, 69, s. 2084-2092.
- 52) LANGOVÁ, L.: Steroidní látky v odpadních vodách – výskyt, metody vzorkování a analytického stanovení. Brno, 2008. 72 s., 16 s.příloh. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.
- 53) YING, G.-G., KOOKANA, R. S., YING, J. R., Occurrence and fate of hormone steroids in the environment- Review article. *Environment International*, 2002, 28,s. 545– 551
- 54) JEŽKOVÁ, Věra. *STANOVENÍ PREDNISOLONU PO ŠTĚPENÍ POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ*. Pardubice, 2009. 68 s. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- 55) TROJAN, Stanislav , et al. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání . Praha : Grada Publishing, a.s., 2003. 761 s
- 56) BARRETT-CONNOR, E., STUENKEL, C. Hormones and Heart disease in Women: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study in perspective. *J Clin Endocrinol Metabol*, 1999, 84, s. 1848–1853.
- 57) CLINICAL SYNTHESIS PANEL ON HRT. Hormone replacement therapy. *Lancet*, 1999, 354, s. 152–155.
- 58) BORUM, ML., HSIA, JL. (Eds), Women's Health Issues, Part 1. *Med Clin North Am*, 82, Philadelphia : W. B. Saunders Comp., 1998, s. 185.
- 59) PRADHAM, AD., MANSON, JAE., ROSSOUW, JE., et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease. *JAMA*, 2002, 288, s. 980–987.
- 60) ŽÁK, Aleš; ZEMAN, Miroslav. Problematika estrogenů z pohledu vnitřního lékařství. *Postgraduální medicína*. 2003, 5, s. 488-493.
- 61) Cancer facts and figures 2005 : Atlanta. *American Cancer Society*. 2005, 1, s. 170-175.

- 62) WREN, BG. Do female sex hormones initiate breast cancer? A review of the evidence. *Climacteric*. 2004, 7, s. 120–128.
- 63) SIMPSON, E; RUBIN, G; CLYNE, C. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *TEM*. 2000, 11, s. 184-188.
- 64) CAVALIERI, E.L.; STACK, D.E.; DEVANESAN, P.D. Molecular origin of cancer : Catechol estrogen–3, 4–quinones as endogenous tumor initiators.. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*. 1997, 94, s. 10937-10942.
- 65) HUANG, CS; CHERN, HD; CHANG, KJ. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen–metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT : A multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res*. 1999, 59, s. 4870–4875.
- 66) SIMPSON, ER. Biology of Aromatase in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2000, 1, s. 251-258
- 67) HUANG, Z; HANKINSON, SE; COLDITZ, GA. Dual effect of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA*. 1997, 278, s. 1407–1711
- 68) SASANO, H, et al. Aromatase and 17 –hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81, s. 4042-4046
- 69) SASANO, H, et al. Aromatase in human bone tissue. *J Bone Mineral Res*. 1997, 12, s. 1416-1423
- 70) PASQUALINI, JR; CELLY, C; NGUYEN, BL. Importance of estrogen sulfates pathway in breast tumors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1989, 34, s. 155-163
- 71) AGARWALL, VR, et al. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer–free and breast cancer patients. *J Endocrinol Metab*. 1996, 81, s. 3843–3849
- 72) AGARWALL, VR, et al. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer–free and breast cancer patients. *J Endocrinol Metab*. 1996, 81, s. 3843–3849
- 73) SAJI, S; JENSEN, EV; NILSSON, S. Estrogen receptors and in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci*. 2000, 97, s. 337–342.
- 74) DICKSON, RB; LIPMAN, ME. Growth factor in breast cancer. *Endocrine Rev*. 1995, 16, s. 559–598.

- 75) COWLEY, SM; HOARE, S; MOSSELMAN, S. Estrogen receptor and form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 1997, 272, s. 19858–19862
- 76) HEŘMANN, Jiří ; HŮLEK, Petr. *Hepatologie*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2010. 616 s
- 77) SHERLOCKOVÁ, Sheila; DOOLEY, James. *Nemoci jater a žlučových cest*. Hradec Králové : Olga Čermáková, 2004. 703 s.
- 78) SCHNEIDERKA, Petr, et al. *Kapitoly z klinické biochemie*. Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2004. 365 s.
- 79) SUOMINEN, P, et al. *CRP Guide*. Espoo : Orion Diagnostica, 2002. 4 s.
- 80) GROFOVÁ, Zuzana. *Nutriční podpora : Praktický rádce pro sestry*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2007. 237 s.
- 81) PALMER, DG., EADS, J., Intrahepatic cholestasis of pregnancy: a critical review. *J Perinat Neonat Nurs*, 2000, 14, s. 39 – 51.
- 82) CAMPOS, GA., GUERRA, FA., IZRAEL EJ., Effects of cholic acid infusion in fetal lambs. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1986, 65, s. 23 – 26.
- 83) KOKRDOVÁ, Zuzana; HŮLEK, Petr . Intrahepatální cholestáza těhotných. *Folia gastroenterol hepatol*. 2008, 6, 1, s. 19-23.
- 84) LAMMERT, F. MARSHALL HU., GLANTZ A. et. al., Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol*, 2000, 33, s. 1012 – 1021.
- 85) JACQUEMIN, E., CRESTEIL, D., MANOUVRIER S. et. al., Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet*, 1999, 353, s. 210 – 211.
- 86) LAMMERT, F; MARSCHALL, HU; GLANTZ, A. Intrahepatic cholestasis of pregnancy : Molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol*. 2000, 33, s. 1012-1021.
- 87) VAN MIL, SW; HOUWEN, RH; KLOMP, LW. Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *J med genet*. 2005, 42, s. 449-463.
- 88) PARKIN, DM., Cancers of the breast, endometrium and ovary: geographic correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989, 25, s. 1917 – 1925.
- 89) SLIVA, J., Sójové isoflavony v nevšedních souvislostech. *Klimakterická medicína*, 2010, 15, s. 13 – 17.

- 90) TESCHKE, R., Black cohosh and suspected hepatotoxicity: inconsistencies, confounding variables, and prospective use of diagnostic causality algorithm. A critical review. *Menopause*, 2010, 17, s. 426 – 440.
- 91) FAIT, Tomáš . Otazníky kolem sójových izoflavonů. In *Praktický gynekologie*. Brno : Ambit media, a.s., 2010. s. 99-101.
- 92) VÍTEK, Libor. *Bilirubin a interní choroby : Význam pro kliniku a praxi*. 1.vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 2009. 136 s. ISBN 978-80-247-2351-8.
- 93) CORNELIUS, E.; ARIAS, I. Animal model of human disease. Crigler-Najjar Syndrome. Animal model: hereditary nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in Gunn rats.. *The American Journal of Pathology*. 1972, 69, s. 369-372.
- 94) NEVRTALOVÁ, Eva. *Využití techniky RACE (Rapid amplification of complementary DNA ends) pro identifikaci genů pro metalothioneiny* [online]. 2010. Brno : Mendelova univerzita v Brně Agronomická fakulta Ústav biologie rostlin, 2010 [cit. 2011-07-07]. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/vyuka/Metoda_RACE_metodicky_navod.pdf>.
- 95) KASALOVÁ, Tereza. *Kvantifikace progresu virové infekce virů RaMV a TuRSV pomocí real-time PCR*. České Budějovice, 2008. 25 s. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

7. SEZNAM ZKRATEK

17-bHSD I	17b-hydroxysteroidní dehydrogenáza typu I
17β-HSD	17β-hydroxysteroid dehydrogenáza
AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AhR	arylový uhlovodíkový receptor
AIB1	amplified in Breast Cancer-1
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AP-1	aktivační protein 1
AST	aspartátaminotransferáza

B[a]P	benzo[a]pyren
BSEP	kanalikulární exportní pumpa žlučových solí
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor
cMOAT	kanalikulární multispecifický organický aniontový transportér
COMT	katechol O metyl-trasferáza
CRP	C-reaktivní protein
CYP1A1	cytochrome P4501A1
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát
DRE	dioxinové responzivní elementy
E1	estron
E2	17 β -Estradiol
E3	estradiol
EBM	evidence based medicine
ER	estrogenový receptor
ERE	estrogen response element
ERR	sirotčí nukleární receptory
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FSH	folikuly stimulující hormon
GR	glukokortikoidní receptor
HBD	hormone binding domaine
HDL	high- density cholesterol
HNF1 α	hepatocytární nukleární faktor alfa
HRT	hormonální terapie
HT	hormonální terapie
IBAT	ileal Bile Acid Transporter
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-6	interleukin-6
LDL	light – density cholesterol
LH	luteinizační hormon

MDR 1	protein mnohočetné rezistence vůči lékům 1
MDR 3	fosfolipidový translokátor
NADH	NADH ubichinon-reduktáza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NCoA1	nuclear receptor coactivator 1
NCoA2	nuclear receptor coactivator 2
NCoA3	nuclear receptor coactivator 3
NCoR1	nuclear receptor co-repressor 1
NTCP	na sodíku závislý taurocholátový kotransportní protein
OATP	organický aniontový transportér
OCT	organický kationový přenašeč
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	5'-fosfoadenosin-3'-fosfosulfát
PBREM	fenobarbitalový enhancerový modul
PDP	pyridoxal-5'-fosfát
PGE2	prostaglandin E2
PXR	pregnanový X-receptor
Ras/MAPK	Ras mitogen activated protein kinase
SAMe	S-adenosyl-L-methionin
Ser	serin
SERM	selective ER modulators
SMRT	silencing mediator of retinoic acid
SRC1	steroid receptor coactivator
SULT	sulfotransferáza
TCDD	tetrachlórdibenzo-p-dioxin
TNF α	tumor necrosis factor-alpha
UDCA	kyselina ursodeoxycholová
UGT	UDP-glukuronozyltransferáza